

## **Makromolekulare Nukleotidverbindungen und Methoden zu deren Anwendung**

5

### **Beschreibung der Erfindung**

#### **1. Einführung**

##### **10 1.1 Einordnung in das technologische Feld**

In einer Ausführung bezieht sich die Erfindung auf die Struktur, die Herstellung und die Verwendung modifizierter Nukleotid- und Nukleosidbausteine, im folgenden „Nuk-Makromoleküle“.

15

In einer weiteren Ausführung bezieht sich die Erfindung auf die Struktur, die Herstellung und die Verwendung modifizierter Nukleinsäuremolekülen, z.B. Oligonukleotide.

##### **20 1.2 Stand der Technik:**

Niedermolekulare Stoffe spielen eine wichtige Rolle in lebendigen Organismen. Sie dienen beispielsweise als Bausteine von Polymeren, als Botenstoffe, als Energieträger. In der Diagnostik werden sie eingesetzt zur Bestimmung von medizinisch relevanter Parameter. Dabei werden diese Stoffe oft mit bestimmten Signal-Trägern markiert.

25 Ein Beispiel für die niedermolekulare Stoffe bieten Nukleotide und Nukleoside.

Sie spielen ebenfalls eine zentrale Rolle in unterschiedlichen Stoffwechselvorgängen der lebenden Organismen ("Biochemie und Pathobiochemie", G. Löffler, 2003) und stellen in der modernen Biotechnologie verbreitete Elemente dar ("Molecular-Cloning",  
30 J. Sambrook, band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5), beispielsweise für künstliche Detektionssysteme ("DNA Microarrays", Bowtell, 2003, ISBN 0-87969-624-9, "Microarray-Biochip Technology" M Schena, 2000, ISBN 1-881299-37-6). Aus diesem Grund werden modifizierte Nukleotide, Nukleotid-Analoga, in unterschiedlichen Bereichen der Biotechnologie, Medizin und Pharmakologie eingesetzt ("Nucleotide  
35 Analogs" Scheit, 1980, ISBN 0-471-04854-2, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry", Kisakürek 2000, "Anti-HIV Nucleosides" Mitsuya, 1997, "Nucleoside Analogs in cancer therapy", Cheson, 1997).

Eines der wichtigsten Felder der modernen Life-Science sind Analysen der Nukleinsäuren. Ein großer Bereich dieser Analysen befasst sich mit dem Nachweis der Nukleinsäuren oder deren Bestandteilen im biologischen Präparat. In vielen Fällen wird zu diesem Zweck ein Reaktionspartner markiert, der mit der zu analysierenden Nukleinsäure reagieren kann. Dem Fachmann sind unterschiedliche Möglichkeiten zur Markierung der Nukleinsäuren bekannt. Einerseits können einzelne Nukleinsäurebausteine, Nukleotide bzw. Nukleoside modifiziert sein, andererseits können kurze Fragmente von Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder Polynukleotide zum Nachweis eingesetzt werden.

Konventionell modifizierte Nukleotide sind beispielsweise in Lee et al. Nucleic acid research 1992, V. 20, S.2471; Augustin et. al. J. Biotechnology 2001 V. 86, S.289-301; US Patent 4828979; Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30, S. 3857 beschrieben. Diese Nukleotide haben einen niedermolekularen detektierbaren Teil, der direkt (wie beispielsweise ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül) oder indirekt detektiert werden kann (wie beispielsweise bei einem Biotin-Molekül, das erst nach Kopplung mit einem Streptavidin-Farbstoff-Konjugat nachgewiesen wird) ). Solche Nukleotide stellen Beispiele für die Stand der Technik der Nukleotid-Modifikationen dar. Viele modifizierte Nukleotide können kommerziell erworben werden, z.B. von NEN Life Science Products ( Biotin-11-dUTP, DNP-11-dATP, Fluorescein-12-dCTP), von Amersham Bioscience ( dCTP-Cy3, dCTP-Cy5) oder von Roche (Biotin-16-dUTP). Entsprechende Nachweisreagenzien, z.B. markiertes Streptavidin, markierte Antikörper, können von den selben Anbietern bezogen werden. Auch modifizierte Nukleoside werden für den Nachweis von Nukleinsäuren eingesetzt (Trilink Biotechnologies, Eurogentec, MWG-Biotech).

Zur Vereinfachung der Darstellung werden im Folgenden modifizierte Nukleotide besprochen. Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, dass auch modifizierte Nukleoside für die enzymatische und nicht enzymatische Synthesen eingesetzt werden können, konventionell modifizierte Nukleoside sind erhältlich beispielsweise bei Trilink Biotechnologies oder Eurogentec.

Konventionell modifizierte Nukleotide haben ein äquimolares Verhältnis zwischen der Nukleotid-Komponente und dem niedermolekularen detektierbaren Teil, z.B. Farbstoff-Molekül bzw. Biotin-Molekül. Zwischen beiden Teilen liegt ein Linker mit einer durchschnittlichen Länge von 5 - 30 Atomen.

Solche Nukleotide können von Polymerasen in den wachsenden Strang eingebaut werden und somit ein signaltragendes Molekül (Farbstoff) oder signalvermittelndes Molekül (Biotin oder Digoxigenin) in die Nukleinsäurekette einführen. Nach dem Einbau von modifizierten Nukleotiden kann die Signaldetektion im Fall von

farbstoffmarkierten NT direkt erfolgen oder nach Inkubation mit einem sekundären signaltragenden Molekül (z.B. Streptavidin-Farbstoff-Konjugat im Fall von Biotin), wenn signalvermittelnde Moleküle verwendet werden. Die nachträgliche Kopplung der signaltragenden Moleküle, wie Streptavidin, erfolgt oft mit unzureichenden Ausbeuten von 20-60%.

Sehr oft werden bei der Markierung der Nukleinsäuren Signalvervielfältigungsschritte eingesetzt. Diese können auf unterschiedlichen Stufen der Analyse durchgeführt werden. Beispiele dafür stellen Materialvervielfältigung (PCR), mehrfacher Einbau von markierten Nukleotiden, mehrstufige nachträgliche Markierung von Biotin-Nukleotiden ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, Band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5). Diese Verfahren führen zu einer Verzerrung der Signale, da sie aus mehreren, oft ungenügend kontrollierten Schritten bestehen, die mit unterschiedlichen Ausbeuten ablaufen und von vielen Faktoren beeinflusst werden können.

Die gewünschte und für den Fachmann naheliegende Signalverstärkung durch eine mehrfache Markierung eines Nukleotids bereits während der Nukleotid-Synthese erweist sich in Kombination mit herkömmlichen Nukleotidstrukturen als sehr großer Nachteil. Zwar können solche Nukleotide ohne größeren Aufwand hergestellt werden (Beispiel 25), verlieren aber ihre Funktion als Substrat für Polymerasen (Beispiel 34B) und andere Enzyme. Die Ursache dafür liegt in der Veränderung der Eigenschaften der Nukleotide in Folge der Kopplung an ein wesentlich größeres Molekül.

Bestimmte Verfahren, beschrieben beispielsweise in Seeger WO 0018956, Kartalov WO02072892, sind auf die Detektion der Signale von einzelnen Nukleotid-Molekülen angewiesen. Beim Einsatz konventioneller Nukleotide beeinflussen mehrere Phänomene wie z.B. das Ausbleichen der Farbstoffe oder Blinking die Ergebnisse der Einzelmoleküldetektion. Für solche Verfahren bedeutet eine Steigerung von Signalstärke und Intensität der Nukleotidmarkierung eine Verringerung der Fehlerrate bei der Detektion.

Es besteht somit ein Bedarf an modifizierten Nukleotiden oder Nukleosiden mit einer verbesserten signalgebenden oder signalvermittelnden Wirkung, insbesondere für deren Einsatz zur Markierung von Nukleinsäuren bei der Nukleinsäureanalyse.

### **Aufgaben der Erfindung:**

- Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist folglich die Bereitstellung von modifizierten Nukleotiden oder Nukleosiden, die ihre Substrateigenschaften für Polymerasen oder andere Enzyme beibehalten und nach ihrem Einbau in die Nukleinsäuren eine verbesserte Signalintensität bei deren Analyse gewährleisten.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung von Verfahren zur Markierung von Nukleinsäuren mit erfindungsgemäß modifizierten Nukleotiden.

- Die vorliegende Erfindung beschreibt in einer Ausführungsform eine neue Klasse an modifizierten Nukleotiden, die Nuk-Makromoleküle. Nuk-Makromoleküle sind dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere Nukleotid-Komponenten mit einem oder mehreren signalgebenden oder signalvermittelnden makromolekularen Komponenten (Marker) über einen langen Linker verbunden sind. Die jeweilige Nuk-Komponente bewahrt in einem Nuk-Makromolekül seine Substratfunktion und kann z.B. durch Polymerasen in einen wachsenden Strang eingebaut werden. Eine signalgebende makromolekulare Komponente trägt beispielsweise mehrere Farbstoffmoleküle.

- Nuk-Makromoleküle können wie konventionell modifizierte Nukleotide in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie und Medizin verwendet werden. Im Folgenden sollte lediglich als Beispiel deren Einsatz für die Nukleinsäuremarkierung dargestellt werden. Andere Einsatzbereiche der Nuk-Makromoleküle sind dem Fachmann bereits bekannt s.o.

### **1.3 Begriffe / Definitionen:**

- 1.3.1. Makromolekulare Verbindung** - ein Molekül, ein Molekülkomplex, ein Nanokristall oder Nanoteilchen, dessen Masse zwischen 2kDa und 20kDa, 2kDa und 50kDa, 2kDa und 100kDa, 100kDa und 200kDa, 200kDa und 1000kDa oder 1MDa und 100MDa oder 100 MDa und 100GDa liegt. Beispiele für makromolekulare Verbindungen sind Nukleinsäuren, wie Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als 10 Nukleotiden, Polynukleotide, Polypeptide, Proteine oder Enzyme, Quantum Dots, Polymere wie PEG, Mowiol, Polyacrylat, Nanogold-Partikel aber auch Komplexe, die aus mehreren Makromolekülen bestehen.

- 1.3.2. Niedermolekulare Verbindung** - ein Molekül oder ein Molekülkomplex, dessen Masse kleiner 2000 Da (2kDa) beträgt, z.B. Biotin, natürliche Nukleotide, dATP, dUTP, viele Farbstoffe, wie Cy3, Rhodamine, Fluorescein, Linker mit einer



durchschnittlichen Länge zwischen 5 und 30 Atomen, seltene Erden und konventionell modifizierte Nukleotide, wie Biotin-16-dUTP.

- 5 **1.3.3. Ein Nuk-Makromolekül** im Sinne dieser Anmeldung ist eine chemische Struktur, die eine oder mehrere Nuk-Komponenten, eine oder mehrere Linker-Komponenten und eine Marker-Komponente einschließt, Fig. 1 oder 2:

$(\text{Nuk-Linker})_n\text{-Marker}$

10 wobei:

- Nuk - eine Nuk-Komponente ist
- Linker - eine Linker-Komponente ist
- Marker - eine Marker-Komponente ist
- n - eine ganze Zahl zwischen 1 und 100 ist

15

In bevorzugter Ausführungsform besteht die Linker-Komponente aus einer Kopplungseinheit L für die Kopplung des Linkers an die Nuk-Komponente, aus einem wasserlöslichen Polymer und aus einer Kopplungseinheit T für die Kopplung des Linkers an die Marker-Komponente. In dieser bevorzugten Ausführungsform hat ein

20 Nuk-Makromolekül folgende Struktur, Fig. 1 oder 2:

$(\text{Nuk-L- Polymer-T})_n\text{-Marker}$

wobei:

- 25 Nuk - ein Nukleotid- oder ein Nukleosid-Monomer ist (Nuk-Komponente)
- L - ein Teil des Linkers ist, das die Verbindung zwischen Nuk und dem Linkerrest darstellt (Kopplungseinheit L)
- T - ein Teil des Linkers ist, das die Verbindung zwischen dem Linkerrest und dem Marker darstellt (Kopplungseinheit T)
- 30 Polymer - ein Teil des Linkers ist, das ein wasserlösliches Polymer mit einer durchschnittlichen Länge zwischen 100 und 10.000 Atome ist  
(Kopplungseinheit L, Polymerlinker, Kopplungseinheit T sind bei dieser Ausführungsform als Linker-Komponente zusammengefaßt)
- Marker - eine Marker-Komponente
- 35 n - eine ganze Zahl zwischen 1 und 100

Nuk-Makromoleküle sind durch eine Kombination aus einer oder mehreren Nuk-Komponenten, entsprechend einem oder mehreren langen Linker-Komponenten und einer Marker-Komponente definiert.

### 5    **1.3.3.1 Nuk-Komponente**

Nuk-Komponente kann sowohl ein Nukleotid als auch ein Nukleosid darstellen. Im folgenden werden bei der Beschreibung Nukleotide betrachtet. Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, dass auch Nukleoside in entsprechender Weise modifiziert und in entsprechenden Reaktionen werden können.

10

In einer Ausführungsform ist Nuk-Komponente ein Nukleotid- oder ein Nukleosid-Monomer, das mit der Linker-Komponente gekoppelt ist. Prinzipiell können alle als Substrat für Nukleotid-akzeptierende Enzyme geeigneten konventionellen Nukleotid-Varianten als Nuk-Komponente des Nuk-Makromoleküls dienen, so dass sowohl

15

natürliche als auch modifizierte Nukleotide (Nukleotid-Analoga) für die Nuk-Komponente in Frage kommen. Bei modifizierten Nukleotiden können Base-, Zucker- oder Phosphat-Teile modifiziert werden, Fig. 3. Viele Beispiele für Nukleotid-Modifikationen sind dem Fachmann bekannt ("Advanced organic chemistry of nucleic acids", 1994, Shabarova, ISBN 3-527-29021-4, "Nucleotide Analogs" Scheit, 1980, ISBN 0-471-04854-2, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry", Kisakürek 2000, "Anti-HIV Nucleosides" Mitsuya, 1997, "Nucleoside Analogs in cancer therapy", Cheson, 1997) im Text werden auch weitere Beispiele für die Modifikationen der Nukleotide angegeben.

20

Die Nuk-Komponente schließt vorzugsweise eine Base-Komponente (Base), eine Zucker-Komponente (Zucker) und wahlweise eine Phosphat-Komponente (Phosphat) ein. Base, Zucker und Phosphat können modifiziert sein, d.h. die Grundstruktur sieht den natürlichen Nukleotiden oder Nukleosiden ähnlich, trägt aber beispielsweise zusätzliche chemische Gruppen. Beispiele für Kombinationen aus verschiedenen Komponenten sind dem Fachmann bekannt. Solche Nuk-Komponenten können in vielen enzymatischen und chemischen Reaktionen eingesetzt werden (G. Wright et al. Pharmac.Ther. 1990, V. 47, S. 447-).

25

30

In einer anderen Ausführungsform ist eine Nuk-Komponente mit weiteren Nukleotiden gekoppelt, z.B. in einer Nukleinsäurekette. Dabei tritt die Nuk-Komponente als ein Monomer eines Polymers auf.

35

#### **1.3.3.1.1 Variationen am Phosphat**

In einer Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid dar. In einer anderen Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid-Monophosphat dar. In einer anderen Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid-Diphosphat dar. In einer weiteren Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid-Triphosphat dar. Auch höhere Phosphat-Derivate (Tetraphosphat usw.) können verwendet werden.

Die genannten Phosphatmodifikationen können wie bei Nukleosid-Triphosphaten an der 5'-Position oder auch an anderen Positionen des Zucker-Teils des Nukleotides sitzen, beispielsweise an der 3'-Position.

Wahlweise kann die Phosphat-Komponente Modifikationen einschließen, solche Modifikationen schließen beispielsweise in einer Ausführungsform einen Linker ein (D. Jameson et al. Methods in Enzymology 1997, V. 278, S. 363-, A. Draganescu et al. J. Biol.Chem. 2000 v.275, 4555-). In einer weiteren Ausführungsform schließt die Phosphat-Komponente der Nuk-Komponente Thiotriphosphat-Verbindungen ein (Burgess et al. PNAS 1978 v. 75, S. 4798-).

In einer weiteren Ausführungsform schließt die Phosphat-Komponente der Nuk-Komponente geschützte Phosphat-Gruppen (z.B. Phosphoroamidite) ein.

In einer Ausführungsform stellt die Phosphat-Komponente die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente der Nuk-Makromoleküle dar.

#### **1.3.3.1.2 Variationen an der Base**

Die Nuk-Komponente kann ein in der Natur in den Nukleinsäuren vorkommendes Nukleotid oder Nukleosid oder seine Analoga darstellen, vorzugsweise die an Watson-Crick-Paarbildung teilnehmern, beispielsweise Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin, Uracil, Inosin, oder eine modifizierte Base, wie z.B. 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, 6-Thioadenin, einschließen, Literatur s. oben. Wahlweise kann die Base Modifikationen einschließen, solche Modifikationen schließen beispielsweise in einer Ausführungsform einen an die Base gekoppelten Linker wie beispielsweise ein Amino-propargyl-Linker oder ein Amino-Allyl-Linker ein, weitere Beispiele für die Linker sind bekannt (G. Wright et al. Pharmac.Ther. 1990, V. 47, S. 447-, Hobbs et al. US Patent 5.047.519 oder andere Linker z.B. Klevan US Pat. 4,828,979, Seela US pat. 6211158, US pat. 4804748, EP 0286028, Hanna M. Method in Enzymology 1996 v.274, S.403, Zhu et al. NAR 1994 v.22 S.3418, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, v. 278, S. 363-, Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30 3857-, Held et al. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids, 2003, v. 22, S. 391, Short US Pat. 6579704, Odedra WO 0192284). In einer Ausführungsform stellt der an die Base gekoppelte Linker die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente der Nuk-

Makromoleküle dar. Weitere Modifikationen an der Base sind beispielsweise im Katalog von Trilink Biotechnologies, Inc. San Diego, USA, Ausgabe 2003 auf Seite 38 aufgeführt.

#### 5     **1.3.3.1.3 Variationen am Zucker**

Dem Fachmann sind verschiedene Variationen der Zucker-Komponente der Nukleotide bekannt, die z.B. in der Diagnostik, Therapie oder Forschung eingesetzt werden.

Solche Variationen schließen z.B. Ribose, 2'-Deoxyribose oder 2',3'-Dideoxyribose ein. Wahlweise kann die Zucker-Komponente Modifikationen einschließen (M. Metzger

10 et al. Nucleic Acid Research 1994, V. 22, 4259-), solche Modifikationen schließen beispielsweise in einer Ausführungsform einen Linker ein. Die modifizierende Gruppe oder Linker kann beispielsweise reversibel an die Zucker-Komponente gekoppelt sein (Hovinen et al. J.Chem.Soc.Prking Trans. 1994, S. 211-, Canard US Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Ju et al. US Pat. 6664079, 15 Fahnestock et al. WO 91066678, Cheeseman US Pat. 5302509, Parce et al. WO 0050642, Milton et al. WO 2004018493, Milton et al. 2004018497).

In einer Ausführungsform stellt der an die Zucker-Komponente gekoppelte Linker die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente der Nuk-Makromoleküle dar.

20 In einer weiteren Ausführungsform schließt die Zucker-Komponente z.B. folgende Modifikationen ein: wahlweise kann die 3'- oder die 2'-OH-Gruppen durch folgende Atome oder Gruppen ersetzt werden: Halogenatome, Wasserstoff, Amino-, Merkapto- oder Azido-Gruppe (Beabealashvilli et al. Biochem Biophys Acta 1986, v.868, 136-, 25 Yuzhanov et al. FEBS Lett. 1992 v. 306, 185-).

In einer weiteren Ausführungsform schließt die Nuk-Komponente azyklische Nukleotid- oder Nukleosid-Modifikationen ein (A. Holy Current Pharmaceutical Design 2003 v. 9, 2567-, G. Wright et al. Pharmac.Ther. 1990, V. 47, S. 447-). In einer weiteren 30 Ausführung kann die Zucker-Komponente eine Doppelbindung einschließen. In der Anmeldung werden 2'-Deoxynukleotide, beispielsweise 2'-Deoxyuridin-Triphosphat, 2'-Deoxycytidin-Triphosphat, 2'-Deoxyadenosin-Triphosphat, 2'-Deoxyguanosin-Triphosphat als dUTP, dCTP, dATP und dGTP bezeichnet.

#### 35     **1.3.3.1.4 Kopplung von NT und Linker**

Die Nuk-Komponente ist an einer Kopplungsstelle mit dem Linker verbunden. Die Kopplungsstelle des Linkers an die Nuk-Komponente kann sich an der Base, am Zucker (Ribose bzw. Deoxyribose), oder am Phosphat-Teil befinden.

- 5 Die Verbindung zwischen der Linker-Komponente und der Nuk-Komponente ist vorzugsweise kovalent.

Wenn die Kopplungsstelle an der Base liegt, so befindet sie sich vorzugsweise an den Positionen 4 oder 5 bei Pyrimidin-Basen und an den Positionen 6,7,8 bei den Purin-Basen. Am Zucker können die Positionen 2', 3', 4' oder 5' die Kopplungsstellen darstellen. Die Kopplung an die Phosphatgruppen kann an der alpha, beta, oder gamma-Phosphatgruppe erfolgen. Beispiele für die Kopplungsstelle an der Base sind in Short WO 9949082, Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382 (siehe auch kommerziell erhältliche Nukleotide (Amersham, Roche), an der Ribose in Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363, Canard US Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642., an Phosphatgruppen in Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363 beschrieben.

- 20 Die Position der Kopplungsstelle hängt vom Einsatzgebiet der NT-Makromoleküle ab. So werden beispielsweise für die Markierung von Nukleinsäuren, die am Nukleinsäurestrang verbleiben soll, vorzugsweise Kopplungsstellen am Zucker oder an der Base verwendet. Die Kopplung an die Gamma- oder Beta-Phosphatgruppen kann beispielsweise dann erfolgen, wenn die Markierung beim Einbau des Nuk-Makromoleküls freigesetzt werden soll.

- 25 Die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente erfolgt über eine Kopplungseinheit (L), die ein Teil der Linker-Komponente ist.

- 30 Die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker kann in einer Ausführungsform widerstandsfähig sein, z.B. bei Temperaturen bis zu 130°C, für pH-Bereiche zwischen 1 und 14, und/oder resistent gegen hydrolytische Enzyme (z.B. Proteasen, Esterasen) sein. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker unter milden Bedingungen spaltbar.

- 35 Diese spaltbare Verbindung ermöglicht die Entfernung der Linker- und der Marker-Komponenten. Dies kann beispielsweise in den Verfahren der Sequenzierung durch die Synthese von Bedeutung sein, wie Pyrosequencing, BASS (Canard et al. US Patent

5.798.210, Rasolonjatovo Nucleosides & Nucleotides 1999, V.18 S.1021, Metzker et al. NAR 1994, V.22, S.4259, Welch et al. Nucleosides & Nucleotides 1999, V.18, S.19, Milton et al. WO 2004018493, Odedra et al. WO 0192284) oder single molecule sequencing, Tcherkassov WO 02088382. Ihre Wahl ist nicht eingeschränkt, sofern sie unter den Bedingungen der enzymatischen Reaktion stabil bleibt, keine irreversible Störung der Enzyme (z.B. Polymerase) verursacht und unter milden Bedingungen abgespalten werden kann. Unter "milden Bedingungen" sind solche Bedingungen zu verstehen, die zum Beispiel Nukleinsäure-Primer-Komplexe nicht zerstören, wobei z.B. der pH-Wert vorzugsweise zwischen 3 und 11 und die Temperatur zwischen 0°C und einem Temperaturwert (x) liegt. Dieser Temperaturwert (x) hängt von der T<sub>m</sub> des Nukleinsäure-Primer-Komplexes (T<sub>m</sub> ist der Schmelzpunkt) und wird beispielsweise als T<sub>m</sub> (Nukleinsäure-Primer-Komplex) minus 5°C errechnet (z.B. T<sub>m</sub> ist 47°C, dann liegt die maximale Temperatur bei 42°C; unter diesen Bedingungen eignen sich besonders Ester-, Thioester-, Acetale, Phosphoester-, Disulfid-Verbindungen und photolabile Verbindungen als spaltbare Verbindungen).

Vorzugsweise gehört die genannte spaltbare Verbindung zu chemisch oder enzymatisch spaltbaren oder photolabilen Verbindungen. Als Beispiele von chemisch spaltbaren Gruppen sind Ester-, Thioester-, Disulfid-, Acetal-Verbindungen bevorzugt (Short WO 9949082, „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993 CRC Press Inc., Herman et al. Method in Enzymology 1990 V.184 S.584, Lomant et al. J.Mol.Biol. 1976 V.104 243, "Chemistry of carboxylic acid and esters" S.Patai 1969 Interscience Publ.). Beispiele für photolabile Verbindungen können in folgenden Literaturstellen gefunden werden: Rothschild WO 9531429, "Protective groups in organic synthesis" 1991 John Wiley & Sons, Inc., V. Pillai Synthesis 1980 S.1, V. Pillai Org. Photochem. 1987 V.9 S.225, Dissertation „Neue photolabile Schutzgruppen für die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese“ H.Giegrich, 1996, Konstanz, Dissertation „Neue photolabile Schutzgruppen für die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese“ S.M.Bühler, 1999, Konstanz).

#### **1.3.3.1.5 Zahl der gekoppelten Nuk-Komponenten**

In einer Ausführungsform der Erfindung ist pro ein Nuk-Makromolekül nur eine Nuk-Komponente gekoppelt. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung sind mehrere Nuk-Komponenten pro Nuk-Makromolekül gekoppelt. Mehrere Nuk-Komponenten können einheitlich oder unterschiedlich sein, wobei beispielsweise durchschnittlich 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 25, 25 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 250, 250 bis 500, 500 bis 1000 Nuk-Komponenten pro ein Nuk-Makromolekül gekoppelt sein können.

### 1.3.3.2 Linker-Komponente

Die Bezeichnung Linker oder Linker-Komponente wird synonym in der Anmeldung verwendet und bezieht sich auf den gesamten strukturellen Abschnitt des Nuk-Makromoleküls zwischen der Nuk-Komponente und der Marker-Komponente.

5

#### 1.3.3.2.1 Linker-Bestandteile

Die Linker-Komponente stellt einen Teil des Nuk-Makromoleküls dar, das zwischen der jeweiligen Nuk-Komponente und der Marker-Komponente liegt. Die Linker-Komponente hat in ihrer Struktur vorzugsweise folgende Bestandteile:

- 10    1) Kopplungseinheit L  
      2) wasserlösliches Polymer  
      3) Kopplungseinheit T

15    Die Aufteilung der Linker-Komponente in einzelne Bestandteile ist rein funktionell und soll lediglich der Anschaulichkeit der Struktur dienen. Je nach Betrachtungsweise können einzelne Strukturen des Linkers zum einen oder zum anderen funktionellen Bestandteil gerechnet werden.

20    Die Kopplungseinheit L hat die Funktion, die Linker-Komponente und die Nuk-Komponente zu verbinden. Bevorzugt sind kurze, unverzweigte Verbindungen, bis max. 20 Atome in der Länge. Die jeweilige Struktur der Kopplungseinheit L hängt von der Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid und von dem jeweiligen Polymer des Linkers. Einige Beispiele für die Kopplungseinheiten L sind in Beispielen 1 bis 33 angegeben. Viele konventionell modifizierte Nukleotide tragen einen kurzen Linker,  
25    diese kurzen Linker dienen als weitere Beispiele für die Kopplungseinheit L, z.B. kurze Linker an der Base: Short WO 9949082, Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382 (siehe auch kommerziell erhältliche Nukleotide (Amersham, Roche), kurze Linker an der Ribose in Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363, Canard US. Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Ju et al. US Pat. 6664079, Parce WO 0050642., kurze Linker an Phosphatgruppen in Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363 .  
30

Noch weitere Beispiele für die Kopplungseinheit L sind nachfolgend angegeben:

35     $R_6\text{-NH-R}_7$ ,  $R_6\text{-O-R}_7$ ,  $R_6\text{-S-R}_7$ ,  $R_6\text{-SS-R}_7$ ,  $R_6\text{-CO-NH-R}_7$ ,  $R_6\text{-NH-CO-R}_7$ ,  $R_6\text{-CO-O-R}_7$ ,  
 $R_6\text{-O-CO-R}_7$ ,  $R_6\text{-CO-S-R}_7$ ,  $R_6\text{-S-CO-R}_7$ ,  $R_6\text{-P(O)}_2\text{-R}_7$ ,  $R_6\text{-Si-R}_7$ ,  $R_6\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-R}_7$ ,  
 $R_6\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-R}_7$ ,  $R_6\text{-A-(CH}_2\text{)}_n\text{-R}_7$ ,  $R_6\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-B-R}_7$ ,  
 $R_6\text{-(CH=CH-)}_n\text{-R}_7$ ,  $R_6\text{-(A-CH=CH-)}_n\text{-R}_7$ ,  $R_6\text{-(CH=CH-B-)}_n\text{-R}_7$ ,

$R_6-A-CH=CH-(CH_2)_n-R_7$ ,  $R_6-(-CH=CH-CH_2)_n-B-R_7$ ,  $R_6-(-CH=CH-CH_2-CH_2)_n-B-R_7$ ,  
 $R_6-(C\equiv C)_n-R_7$ ,  $R_6-(A-C\equiv C)_n-R_7$ ,  $R_6-(C\equiv C-B)_n-R_7$ ,  
 $R_6-A-C\equiv C-(CH_2)_n-R_7$ ,  $R_6-(-C\equiv C-CH_2)_n-B-R_7$ ,  $R_6-(-C\equiv C-CH_2-CH_2)_n-B-R_7$ ,

5 wobei  $R_6$  - die Nuk-Komponente ist,  $R_7$  - de Polymer ist und A und B folgende strukturelle Elemente einschließen: -NH-, -O-, -S-, -SS-, -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -P(O)<sub>2</sub>-, -Si-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, eine photolabile Gruppe, wobei n - gleich 1 bis 5 ist

10 Die Kopplungseinheit L ist auf einer Seite mit der Nuk-Komponente, auf der anderen mit Polymer kovalent verbunden. Die Art der Kopplung hängt von der Art des Polymers ab. In bevorzugter Form hat das Polymer an seinen Enden reaktive Gruppen, beispielsweise NH<sub>2</sub> (Amino), OH (Hydroxy), SH (Mercapto), COOH (Carboxy), CHO (Aldehyd), Acryl- oder Maleimid, Halogen-Gruppen. Solche Polymere sind käuflich  
 15 erwerblich (z.B. Fluka). Einige Varianten für die Kopplung von Polymeren an die Kopplungseinheiten sind unter Beispielen 1 bis 33 angegeben.

Das wasserlösliche Polymer bildet in einer bevorzugten Ausführungsform den Hauptanteil der Linker-Komponente. Es ist ein Polymer, vorzugsweise hydrophil,  
 20 bestehend aus gleichen oder unterschiedlichen Monomeren. Beispiele für geeignete Polymere stellen Polyethylen-glycol (PEG), Polyamide (z.B. Polypeptide), Polyphosphate, Polyacetate, Poly(alkyleneglycole), Kopolymere aus Ethylenglycol und Propylenglycol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(x-Hydroxy-  
 25 Säuren), Poly-Acrylsäure und ihre Derivate, Poly-Acrylamide in ihre derivate, Poly(Vinylalkohol), Polylactat Säure, polyglycolic Säure, Poly(epsilon-caprolactone), Poly(beta-hydroxybutyrate), Poly(beta-hydroxyvalerate), Polydioxanone, Poly(ethylene terephthalate), Poly(malic Säure), Poly(tartronic Säure), Poly(ortho ester), Polyanhydride, Polycyanoacrylate, Poly(phosphoester), Polyphosphazene,  
 30 Hyaluronidate, Polysulfones.

Dieses Polymer schließt in einer Ausführungsform verzweigte oder weiteren Ausführungsform nicht verzweigte Polymere ein. Das Polymer kann aus mehreren unterschiedlich langen Abschnitten bestehen, wobei jeder Abschnitt aus gleichen  
 35 Monomeren besteht und Monomere in unterschiedlichen Abschnitten unterschiedlich sind. Einem Fachmann sollte naheliegend erscheinen, dass für einen makromolekularen Linker meistens nur eine durchschnittliche Masse bestimmt werden kann, so dass die Angaben zu den Molmassen einen Mittelwert darstellen



("Makromoleküle, Chemische Struktur und Synthesen", Band 1, 4, H. Elias, 1999, ISBN 3-527-29872-X). Aus diesem Grund kann für Nuk-Makromoleküle keine exakte Massenangabe gemacht werden.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung schließt die Linker-Komponente ein lineares, nicht verzweigtes Polymer ein und trägt keine sterisch anspruchsvollen chemischen Strukturen, wie beispielsweise Farbstoffe, Fluoreszenzfarbstoffe, Liganden. Solche Linker ermöglichen eine geringe sterische Hinderung der enzymatischen Erkennung der Nuk-Komponenten.

10

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Polymer der Linker-Komponente linear, die Linker-Komponente trägt jedoch eine oder mehrere sterisch anspruchsvollen chemischen Strukturen, wie beispielsweise Farbstoffe. Die Einführung der sterisch anspruchsvollen Gruppen erlaubt bei manchen Verfahren eine

15 Kontrolle der enzymatischen Reaktion (Tcherkassov WO 02088382).

#### **1.3.3.2.2 Linker-Länge**

- Die Linkerlänge beträgt zwischen 50 bis 60, 60 bis 70, 70 bis 80, 80 bis 90, 90 bis
- 20 100, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10.000, 10000 bis 100000 Atome (gezählt werden Ketten-Atome), somit beträgt die durchschnittliche Linker-Länge zwischen 50 bis 60, 60 bis 70, 70 bis 80, 80 bis 90, 90 bis 100, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10.000, 10000 bis 100000 Angström (gemessen an einem potenziell maximal
- 25 ausgestrecktem Molekül).

Falls ein Nuk-Makromolekül mehrere Linker-Komponenten einschließt, können diese Linker-Komponenten untereinander gleiche oder auch unterschiedlich lang sein.

- 30 Einige Abschnitte des Linkers können rigide Bereiche enthalten und andere Abschnitte können flexible Bereiche enthalten.

- Es wird einem Fachmann naheliegend erscheinen, dass die angeführten Linker-Längen eine beträchtlich größere Molekül-Größe und -Masse haben können, als die jeweilige
- 35 Nuk-Komponente selbst. Die Angaben der Linker-Längen betreffen eine durchschnittliche Zahl der Ketten-Atome.

#### **1.3.3.2.3 Linker-Kopplung in einem Nuk-Makromolekül**

Der Linker ist an einer Seite an die Nuk-Komponente und auf der anderen Seite an die Marker-Komponente gebunden. Dazu hat der Linker an seinen Enden Kopplungseinheiten, die diese Funktion erfüllen. Die Verbindung mit der Nuk-Komponenten wurde oben erörtert. Die Verbindung zwischen dem Linker und der Marker-Komponenten erfolgt über Kopplungseinheit T. Bevorzugt sind kurze, unverzweigte Verbindungen, bis max. 20 Atome in der Länge. Die jeweilige Struktur der Kopplungseinheit T hängt von der Kopplungsstelle an der Marker-Komponente und von dem jeweiligen Polymer des Linkers. Die Kopplungseinheit T ist mit dem Polymer kovalent verbunden. Die Art der Kopplung hängt von der Art des Polymers ab. In bevorzugter Form hat das Polymer an seinen Enden reaktive Gruppen, beispielsweise NH<sub>2</sub> (Amino), OH (Hydroxy), SH (Mercapto), COOH (Carboxy), CHO (Aldehyd), Acryl- oder Maleimid, Halogen-Gruppen. Solche Polymere sind kommerziell erhältlich (z.B. Fluka). Einige Beispiele für die Kopplungseinheiten L sind in Beispielen 1 bis 33 angegeben, Weitere Beispiele für die chemische und affine Kopplungen s. in der Literatur: „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993, "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996.

Der Linker kann auch andere funktionelle Gruppen, bzw. Abschnitte enthalten, beispielsweise eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Gruppen (Fig.9) s. Beispiele 22, 23, 24, 31.

Eine spaltbare Verbindung innerhalb des Linkers ermöglicht eine Entfernung eines Teils des Linkers und der Marker-Komponente. Nach der Spaltung verbleibt ein Linker-Rest an der Nuk-Komponente, Beispiele für spaltbare Verbindungen sind im Abschnitt 1.3.3.1.4 angegeben.

#### **1.3.3.3 Marker-Komponente**

Die Marker-Komponente kann unterschiedliche Strukturen haben. Die Strukturen im einzelnen sind nicht eingeschränkt, solange sie die Substrateigenschaften der Nuk-Komponenten für Enzyme nicht aufheben. Diese Struktur hat vorzugsweise eine signalgebende oder eine signalvermittelnde Funktion. Der Marker kann auch andere Funktionen haben, beispielsweise strukturelle, antitoxische oder affine Funktion (beispielsweise in Arzneimittel oder Zubereitungen).

#### **1.3.3.3.1 Die Zusammensetzung der Marker-Komponente (Marker)**

Der Marker schließt in einer Ausführung eine niedermolekulare Marker-Einheit ein. In einer weiteren Ausführungsform schließt der Marker eine makromolekulare Marker-Einheit ein. In einer weiteren Ausführungsform schließt der Marker mehrere

5 niedermolekulare Marker-Einheiten ein. In einer weiteren Ausführungsform schließt der Marker mehrere makromolekulare Marker-Einheiten ein. In einer weiteren Ausführungsform schließt der Marker eine Kombination aus niedermolekularen und makromolekularen Einheiten ein. Die Marker-Einheiten können eine signalgebende oder signalvermittelnde Funktion haben.

10 Diese Einheiten können Moleküle mit geringer Molekularmasse, z.B. unter 2000 Da, oder auch selbst Makromoleküle sein. Dabei schließt die Zahl der signalgebenden oder signalvermittelnden Einheiten, die zu einer Marker-Komponenten zusammengefaßt sind, folgende Bereiche ein: 1 und 2, 2 und 5, 5 und 20, 20 und 50, 50 und 100, 100

15 und 500, 500 und 1000. 1000 und 10000, 10000 und 100000.

Falls mehrere Marker-Einheiten in einem Marker zusammengefasst sind, sind diese Einheiten in einer Ausführungsform an ein Gerüst gebunden, die Kern-Komponente des Markers (Fig. 4b,c). Diese Kern-Komponente verbindet die Einheiten

20 untereinander. Die Kern-Komponente kann die Verbindung zu einem oder mehreren Nuk-Linker-Komponenten herstellen (Fig 5). Die Kern-Komponente schließt niedermolekulare oder makromolekulare Verbindungen ein.

#### **1.3.3.3.2 Struktur der signalgebenden oder der signalvermittelnden Einheiten des Markers**

Die strukturellen Marker-Einheiten schließen folgende Gruppen ein:

##### **1.3.3.3.2.1 Strukturen mit niedriger Molmasse:**

Biotin-Moleküle, Hapten-Moleküle (z.B. Digoxigenin), radioaktive Isotope (z.B.  $P^{32}$ ,  $J^{131}$ ), oder deren Verbindungen, seltene Erden, Farbstoffe, Fluoreszenzfarbstoffe (viele Farbstoffe sind kommerziell erhältlich z.B. von Molecular Probes, Inc.) mit gleichen oder unterschiedlichen spektralen Eigenschaften, Farbstoffe, die untereinander FRET eingehen.

35 Auch chemisch reaktive Gruppen, wie beispielsweise Amino-, Carboxy-, Merkapto-, Aldehyd-, Jodacetat-, Acryl-, Dithio-, Thioester-Verbindungen können als signalvermittelnde strukturelle Einheiten dienen (Fig. 6a). Nach dem Einbau können diese reaktiven Gruppen mit signalgebenden Elementen, wie beispielsweise Farbstoffe

mit entsprechenden reaktiven Gruppen (beispielsweise NHS-Ester, Merkapto-, Amino-Gruppen) modifiziert werden (Fig. 6b). Allgemeine Grundlagen für die Wahl eines passenden Paares von reaktiven Gruppen sind in „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993 dargestellt.

5

In einer speziellen Ausführungsform erfüllt die Kombination aus einer Nuk-Einheit, einer markomolekularen Linker-Komponente und einem Marker mit niedriger Molmasse bereits die Anforderungen der vorliegenden Erfindung. Solche Verbindungen sind ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung. Sie können sowohl als Zwischenprodukte für die chemische Synthese von Nuk-Makromolekülen mit einem makromolekularen Marker, z.B. dUTP-PEG-Biotin, als auch selbständig in den enzymatischen Reaktionen verwendet werden, wie beispielsweise mit nur einem Farbstoff markierte Nukleotide.

10

15

Als Farbstoffe können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe auftreten, ihre Wahl ist nicht eingeschränkt, solange sie die enzymatische Reaktion nicht wesentlich beeinflussen. Beispiele für Farbstoffe sind Rhodamine (Rhodamin 110, Tetramethylrhodamin, erhältlich bei Fluka-Sigma), Cyanin-Farbstoffe (Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7 von Amersham Bioscience), Coumarine, Bodipy, Fluorescein, Alexa-Farbstoffe: z.B. Alexa 532, Alexa 548, Alexa 555 (Molecular Probes). Viele Farbstoffe sind kommerziell erhältlich, beispielsweise von Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande (im weiteren als Molecular Probes bezeichnet) oder von Sigma-Aldrich-Fluka (Taufkirchen, Deutschland). Beispiele für die Synthese eines Nuk-Makromoleküls mit einem niedermolekularen Marker ist in Beispiel 19, 20, 23, 36, 37, 38 angegeben.

20

25

Nach dem Einbau des Nukleotid-Teils in die Nukleinsäurekette befindet sich der am Linker gekoppelte Marker erfindungsgemäß in einem großen Abstand vom Nukleinsäurestrang, was z.B. zu Verringerung der Einflüsse der Nukleobasen auf die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes führt. Fluoreszenzausbeuten einzelner Farbstoffe werden dadurch weniger von der lokalen Zusammensetzung der Nukleinsäuresequenz beeinflusst, was zum gleichmäßigen Signalintensitäten führt. Die potenzielle intermolekulare Löschung der Fluoreszenz hat dabei einen wesentlich geringeren Einfluß auf die Fluoreszenzsignale von den dicht an einander eingebauten Nuk-Makromolekülen, verglichen mit dem Fall bei den konventionell modifizierten Nukleotiden.

30

35

In einer Ausführungsform schließt ein Marker mehrere Marker-Einheiten ein. Dabei können die Marker-Einheiten untereinander gleiche oder verschiedene Eigenschaften haben. Beispielsweise können Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen

Spektraleigenschaften eingesetzt werden. In einer Ausführungsform werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die FRET-Paare bilden.

#### **1.3.3.3.2.2 Strukturen mit hoher Masse (Makromoleküle)**

5

##### **1.3.3.3.2.2.1 Nanokristalle**

Nanokristalle, z.B. Quantum Dots können als Marker-Einheiten auftreten. Dabei können in einer Marker-Komponente Quantum Dots mit gleichen oder unterschiedlichen spektralen Eigenschaften verwendet werden, US Pat. 6.322.901, US Pat. 6.423.551, US Pat. 6.251.303, US Pat. 5.990.479).

10

##### **1.3.3.3.2.2.2 Nano oder Mikro-Teilchen.**

Nano oder Mikro-Teilchen können als Marker-Einheiten auftreten, wobei die größten Ausmaße dieser Teilchen von 1nm bis 2nm, von 2nm bis 5nm, von 5nm bis 10nm, von 10nm bis 20 nm, von 20nm bis 50nm, von 50nm bis 100nm, von 100 nm bis 200nm, von 200nm bis 500nm, von 500nm bis 1000nm, von 1000 nm bis 5000 nm betragen. Das Material der Teilchen können beispielsweise reine Metalle wie Gold, Silber, Aluminium (beispielsweise Teilchen mit surface plasmon resonance ), - Protein-Au-Konjugate: J. Anal.Chem. 1998, V. 70,S. 5177, - Nukleinsäure-Au-Konjugaten: J. Am. Chem. Soc. 2001, V. 123, S.5164, J. Am. Chem. Soc. 2000, V. 122, S. 9071 , Biochem. Biophys. Res. Commun 2000, V. 274, S. 817, Anal. Chem. 2001, V. 73, S. 4450), - Latex (z.B. Latex-Nanopartikel, Anal. Chem. 2000,V. 72, S. 1979) - Kunststoff (Polystyrene), - paramagnetische Verbindungen / Gemische Zhi ZL et al. Anal Biochem. 2003 Jul 15;318(2):236-43, Dressman D et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 22;100(15):8817-22,, - Metall-Teilchen, - magnetische Verbindungen / Gemische Jain KK. Expert Rev Mol Diagn. 2003 Mar;3(2):153-61, Patolsky F et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2003 May 30;42(21):2372-2376, Zhao X et al. Anal Chem. 2003 Jul 15;75(14):3144-51, Xu H et al. J Biomed Mater Res. 2003 Sep 15;66A(4):870-9, JOSEPHSON Lee et al. US Pat. 2003092029, Kliche KAY-OLIVER et al. WO0119405.

15

20

25

30

##### **1.3.3.3.2.2.3 Proteinmoleküle,**

Proteinmoleküle können als Marker-Einheiten auftreten, wobei sie folgende Gruppen schließen: Enzyme (z.B. Peroxidase, alkalische Phosphatase, Urease, beta-Galaktosidase), - fluoreszierenden Proteine (z.B. GFP ), Antigen-bindende Proteine (z.B. Antikörper, Tetramere, Affibodies (Nord et. Al Nature Biotechnology, V. 15 (S.772-777) oder deren Bestandteile (z.B. Fab-Fragmente), Nukleinsäurebindende Proteine (z.B. Transkriptionsfaktor)

35

#### **1.3.3.3.2.4 Nukleinsäureketten,**

Die Nukleinsäureketten einschließlich der Gruppe, Oligonukleotide, modifizierte Oligonukleotide, können als Marker-Einheiten auftreten. Die Länge der

5 Nukleinsäureketten liegt vorzugsweise in folgenden Bereichen von 10 bis 20, von 20 bis 50, von 50 bis 100, von 100 bis 200, von 200 bis 500, von 500 bis 1000, 1000 bis 5.000, von 5.000 bis 10.000, von 10.000 bis 100.000 Nukleotiden. Es können DNA, RNA, PNA-Moleküle verwendet werden. Nukleinsäureketten können zusätzliche Modifikationen tragen, wie beispielsweise freie Aminogruppen, Farbstoffe und andere  
10 signalgebende Moleküle, z.B. makromolekulare Stoffe, Enzyme oder Nanokristalle (Fig. 7a,c). Modifizierte Nukleinsäureketten sind kommerziell zugänglich, z.B. MWG-Biotech. Weitere Beispiele für Makromoleküle oder Makromolekülkomplexe, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Marker oder Marker-Einheiten in der Marker-Komponente für die Signalverstärkung eingesetzt werden können, sind in US Pat. 4882269, US Pat.  
15 4687732, WO 8903849, US Pat. 6017707, US Pat. 6627469 beschrieben.

#### **1.3.3.3.3 Die Kern-Komponente der Marker-Komponente**

Die Kernkomponente hat die Funktion mehrere strukturelle Elemente der Nuk-Makromoleküle zu binden. Beispielsweise bindet die Kern-Komponente mehrere  
20 Marker-Einheiten zusammen. In einer weiteren Ausführungsform können Linker-Komponenten an die Kern-Komponente gebunden werden s. Fig. 5.

#### **1.3.3.3.3.1 Bestandteile**

In einer Ausführungsform besteht die Kern-Komponente aus einer oder mehreren  
25 niedermolekularen Verbindungen. Sie haben die Funktion, die Marker-Einheiten untereinander zu verbinden. Die Verbindung zwischen der Kern-Komponente und den Marker-Einheiten kann kovalent oder affin sein. Bei kovalenter Bindung können beispielsweise Verbindungen mit allgemeiner Struktur-Formel  $(F)_m-R-(H)_n$  als Ausgangsmaterial dienen, wo (F) und (H) - reaktive Gruppen darstellen, und R - eine  
30 Verbindungskomponente, wobei Zahl solcher Gruppen und ihre Anordnung stark variieren kann. Viele Beispiele sind dem Fachmann bekannt, z.B. Verbindungen aus der Gruppe Cross-Linker („Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993 CRC Press Inc.). Beispielsweise schließen (F) und (H) unabhängig von einander folgende Gruppen ein: NH<sub>2</sub> (Amino), OH (Hydroxy), SH (Mercapto), COOH  
35 (Carboxy), CHO (Aldehyd), Acryl- oder Maleimid.

In einer Ausführungsform besteht die Kern-Komponente aus einem wasserlöslichen Polymer, dabei kann das Polymer aus gleichen oder unterschiedlichen Monomeren bestehen.

- 5 Beispiele für den Kernteil-Komponente stellen Derivate folgender Polymere:  
Polyamide (z.B. Polypeptide), Poly-Acrylsäure, Poly-Acrylamide, Poly-Vinylalkohole,  
Nukleinsäuren, Proteinen. Diese Polymere können linear, globulär, z.B. Streptavidin  
oder Avidin, oder verzweigt sein, z.B. Dendrimere (Fig. 8a). Auch vernetzte lösliche  
Polymere, wie beispielsweise vernetzte Poly-Acrylamide (Crosslinker Bisacrylamid in  
10 Kombination mit Poly-Acrylamid), eingesetzt werden.

Die Kern-Komponente hat vorzugsweise mehrere Kopplungsstellen, an die weitere  
Elemente gebunden werden können, z.B. strukturelle Marker-Einheiten oder Nuk-  
Linker-Komponente.

15

Beispielsweise Poly-Lysin-Moleküle haben multiple freie Aminogruppen, an die  
mehrere Farbstoffmoleküle, Biotinmoleküle, Haptenmoleküle oder Nukleinsäureketten  
gekoppelt werden können. Poly-Lysine haben unterschiedliche Molmasse, z.B. 1000-  
2000, 2000-10000, 10000-50000 Da können käuflich erworben werden.

20

Als weiteres Beispiel für die Kernkomponente dienen Nukleinsäurenstränge, wobei die  
Nukleinsäureketten eine Länge von 10 bis 20, von 20 bis 50, von 50 bis 100, von 100  
bis 200, von 200 bis 500, von 500 bis 1000, 1000 bis 5000, von 5000 bis 10000  
Nukleotiden haben. Diese Nukleinsäuren dienen als Bindungspartner für  
25 sequenzkomplementäre Markereinheiten (Fig. 7b).

In einer weiteren Ausführungsform besteht die Kern-Komponente aus einem  
Dendrimer, z.B. Polypropylenimine, Polyaminoamine. Beispiele für andere Dendrimere  
sind bekannt: Cientifica "Dendrimers", 2003, Technology white papers Nr. 6, Klajnert  
30 et al. Acta Biochimica Polonica, 2001, v. 48, S. 199, Manduchi et al. Physiol.  
Genomics 2002, V.10, S.169, Sharma et al. Electrophoresis. 2003, V. 24, S. 2733,  
Morgan et al. Curr Opin Drug Discov Devel. 2002 Nov;5(6):966-73, Benters et al.  
Nucleic Acids Res. 2002 Jan 15;30(2):E10, Nilsen et al. J Theor Biol. 1997 Jul  
21;187(2):273-84. Viele Dendrimere sind kommerziell erwerblich (Genisphere,  
35 www.genisphere.com, Chimera Biotech GmbH).

Weitere Kombinationen für die Kern-Komponente aus den oben dargestellten  
Bestandteilen sind einem Fachmann naheliegend.

#### 1.3.3.3.2 Kopplung der Marker-Einheiten

Marker-Einheiten können an die Kern-Komponente oder an die Linker-Komponente durch eine kovalente Bindung, beispielsweise über einen Cross-linker (Chemistry of protein conjugation and cross-linking, S. Wang, 1993, ISBN 0-8493-5886-8, "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2), oder über eine affine Kopplung erfolgen, beispielsweise Biotin-Streptavidin-Verbindung oder Hybridisierung von Nukleinsäuresträngen oder Antigen-Antikörper-Wechselwirkung ("Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2).

Die Kopplung von Marker-Einheiten an die Kern-Komponente erfolgt in einer Ausführungsform bereits während der Synthese der Nuk-Makromoleküle.

In einer anderen Ausführungsform erfolgt zunächst die chemische Synthese von Nuk-Makromoleküle, bei denen die Markerkomponente nur aus der Kern-Komponente besteht. Die Kopplung von Marker-Einheiten an die Kern-Komponente erfolgt erst nach dem Einbau von Nuk-Makromoleküle in die Nukleinsäurekette. Durch eine große Zahl der potenziellen Bindungsstellen am Kernteil ist die Wahrscheinlichkeit der Bindung der Marker-Einheiten an die Kern-Komponente und somit an die eingebaute Nuk-Komponente wesentlich größer im Vergleich zu konventionellen Nukleotid-Strukturen. Die Kopplungschemie im einzelnen hängt von der Struktur der Marker-Einheiten und der Struktur der Kern-Komponente ab.

**Kovalente Kopplung:** Die Verbindung zwischen den Marker-Einheiten und der Kern-Komponente kann in einer Ausführungsform widerstandsfähig sein (Beispiel 33), z.B. bei Temperaturen bis zu 100°C, für pH-Bereiche zwischen 3 und 12, und/oder resistent gegen hydrolytische Enzyme (z.B. Esterasen) sein. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker unter milden Bedingungen spaltbar.

Beispiele für die Kopplung von Nukleinsäuren an Dendrimere (entspricht einer Kopplung von Marker-Einheiten an eine Kernkomponente) sind z.B. in Shchepinov et al. Nucleic Acids Res. 1999 Aug 1;27(15):3035-41, Goh et al. Chem Commun (Camb). 2002 Dec 21;(24):2954 dargestellt.



#### **1.3.3.3.3 Kopplung zwischen Linker und Marker**

Die Verbindung zwischen der Linker-Komponente und dem Marker hängt von der jeweiligen Struktur der Marker-Einheiten bzw. der Struktur der Kern-Komponente.

In einer Ausführungsform ist die Linker-Komponente direkt an die signalgebende oder signalvermittelnde Marker-Einheit gebunden, Fig. 4a . Dabei kann der Marker aus nur einer oder mehreren Marker-Einheiten bestehen.

In einer weiteren Ausführungsform sind ein oder mehrere Linker-Komponenten an die Kern- Komponente des Markers gebunden, Fig. 5d. Dabei besteht der Marker aus mehreren Marker-Einheiten.

Die Bindung zwischen der Linker-Komponente und dem Marker kann sowohl kovalent als auch affine erfolgen. Viele Beispiele sind dem Fachmann bekannt, s. z.B.

"Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2. „Chemistry of protein conjugation and crosslinking" Shan S. Wong 1993 CRC Press Inc.).

**Kovalente Kopplung:** Die Verbindung zwischen der Linker-Komponente und dem Marker kann in einer Ausführungsform widerstandsfähig sein, z.B. bei Temperaturen bis zu 130°C, für pH-Bereiche zwischen 1 und 14, und/oder resistent gegen hydrolytische Enzyme (z.B. Proteasen, Esterasen)sein . In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker unter milden Bedingungen spaltbar.

**1.3.3.3.4 Das Verhältnis der Nuk- Komponenten in einem Nuk-Makromolekül**  
Ein Nuk-Makromolekül kann durchschnittlich 1 bis 2, 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 30, 30 bis 100, 100 bis 1000 Nuk-Komponenten einschließen.

In einer Ausführungsform haben alle Nuk-Makromoleküle eine gleiche Anzahl an Nuk-Komponenten pro ein Nuk-Makromolekül. Beispielsweise können pro ein Streptavidin-Molekül maximal 4 Biotin-Moleküle gebunden werden, bei sättigender Konzentration von Nuk-Linker- Komponenten, eine einheitliche Population an Nuk-Makromolekülen entsteht.

In einer anderen Ausführungsform haben die Nuk-Makromoleküle einer Population eine definierte durchschnittliche Anzahl von Nuk- Komponenten pro Nuk-Makromolekül, in der Population selbst findet allerdings eine Verteilung der tatsächlichen Besetzung der Nuk-Makromoleküle mit Nuk- Komponenten statt. Die

Verteilungsangaben von Nuk- Komponenten pro Nuk-Makromolekül stellen in diesem Fall einen Mittelwert dar.

#### **1.3.3.3.5 Das Verhältnis von Marker-Einheiten in einem Nuk-Makromolekül**

- 5 Die Zahl der Marker-Einheiten in einem Nuk-Makromolekül schließt folgende Bereiche ein: 1 und 2, 2 und 5, 5 und 20, 20 und 50, 50 und 100, 100 und 500, 500 und 1000, 1000 und 10000, 10000 und 100000.

In einer Ausführungsform der Erfindung haben Nuk-Makromoleküle eine feste Anzahl von signalgebenden Einheiten pro Marker.

- 10 In einer anderen Ausführungsform kann die Verteilung von Marker-Einheiten in einer Nuk-Makromolekül-Population schwanken und muß nicht notwendigerweise einen konstanten Wert für jedes einzelne Nuk-Makromolekül darstellen.

- 15 In einer Ausführungsform haben alle Nuk-Makromoleküle eine gleiche Anzahl der Marker-Einheiten pro ein Nuk-Makromolekül. Beispielsweise können pro ein Streptavidin-Molekül maximal 4 Biotin-Moleküle gebunden werden, Avidin-Biotin-Technology, Methods in Enzymology v.184, 1990..

- 20 In einer anderen Ausführungsform haben die Nuk-Makromoleküle einer Population eine definierte durchschnittliche Zahl der Marker-Einheiten pro Nuk-Makromolekül, in der Population selbst findet allerdings eine Verteilung der tatsächlichen Besetzung der Nuk-Makromoleküle mit Marker-Einheiten statt. Bei sättigenden Konzentrationen bei der Synthese von Marker-Komponenten findet eine zunehmend einheitlichere Besetzung der Nuk-Makromoleküle mit Marker-Einheiten statt.

- 25 So spielt beispielsweise in Bereichen, wo es um den qualitativen Nachweis geht, die exakte Zahl der Marker-Einheiten pro Nuk-Makromolekül eine untergeordnete Rolle. In solchen Fällen ist das Vorhandensein eines stabilen Signals an sich von Bedeutung.

- 30 Es sollte einem Fachmann naheliegend erscheinen, dass die angeführten Marker-Komponenten eine beträchtlich größere Molekül-Größe und -Masse haben, als die jeweilige Nuk-Komponente selbst. Weiterhin sollten andere Beispiele für makromolekulare Marker-Komponenten einem Fachmann naheliegend erscheinen.

#### **35 1.3.3.3.6 Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle**

Die Nuk-Komponente gebunden an ein Nuk-Makromolekül kann als Substrat für unterschiedliche Enzyme dienen. Beispielsweise dient die Nuk-Komponente, in dieser Ausführungsform als Nukleosid-Triphosphat, als Substrat für eine Polymerase, so dass

die Nuk-Komponente in einen wachsenden Strang durch eine Polymerase eingebaut werden kann und somit das gesamte Nuk-Makromolekül an den Strang kovalent gekoppelt wird.

Weitere Beispiele für Enzyme stellen Kinasen, Phosphorylasen, Transferasen dar.

5

Als Monomer-Teil einer Nukleinsäurekette können Nuk-Makromoleküle ebenfalls als Substrate für Enzyme auftreten, beispielsweise für die 3'- oder 5'-Exonukleasen oder Endonukleasen ("Molecular cloning" 1989, Ed. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory), oder für die entsprechenden Teilaktivitäten von Polymerasen, wie beispielsweise in für real-time-PCR beschrieben (S. Meuer "Rapid cycle real time PCR", Springer 2004, ISBN 3-540-66736-9, T. Weissensteiner "PCR-Technology: current innovations" CRC Press 2004 ISBN 0-8493-1184-5).

10

Die Substrateigenschaften der Nuk-Komponente(n) bestimmt/bestimmen die Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle. So kann die Nuk-Komponente als ein Terminator dienen, so dass nur ein einziges Nuk-Makromolekül eingebaut werden kann. In einer anderen Ausführungsform dient die Nuk-Komponente als ein reversibler Terminator, der die Durchführung einer schrittweise kontrollierten Verlängerungsreaktion erlaubt, wie z.B. in Ju et al. US Pat. 6664079, Tcherkassov WO 02088382 dargestellt ist.

15

20

Als Monomer-Teil einer Nukleinsäurekette können sie alleine für die enzymatischen Eigenschaften bestimmend sein, wie z.B. für Exonuklease-Aktivität. In einer anderen Ausführungsform bestimmen die enzymatischen Eigenschaften nicht nur die Nuk-Komponenten der Nuk-Makromoleküle, sondern auch die benachbarten Nukleotide, wie im Falle der Endonukleasen.

25

#### **1.3.3.3.7 Funktion der Marker**

Die makromolekulare Marker-Komponente kann in einer Ausführungsform eine signalgebende Funktion haben. In einer anderen Ausführungsform hat sie eine signalvermittelnde Funktion. In einer weiteren Ausführungsform hat sie eine katalytische Funktion. In einer weiteren Ausführungsform hat sie eine affine Funktion. In einer weiteren Ausführungsform hat der Marker mehr als nur eine Funktion, sondern z.B. vereinigt sowohl signalgebende als auch eine signalvermittelnde Funktion. Weitere Kombinationen sind nahe liegend.

30

35

Bei der signalgebenden Funktion enthält die Marker-Komponente Bestandteile, die bereits während der chemischen Synthese an Nuk-Makromoleküle gebunden werden, s. Beispiel 33.

- 5 Bei der signalvermittelnden Funktion trägt die Marker-Komponente Bestandteile, die erst durch eine Reaktion mit signalgebenden Molekülen ihre Signaleigenschaften entfalten, s. Beispiel 32.

Beispielsweise können mehrere Biotin-Moleküle, z.B. 100 Biotin-Moleküle, den Marker-Teil bilden. Nach dem Einbau der Nuk-Makromoleküle erfolgt eine Nachweisreaktion mit modifizierten Streptavidin-Molekülen. In einem anderen Beispiel haben die Nukleinsäureketten die signalvermittelnde Funktion. Nach dem Einbau von Nuk-Makromoleküle, erfolgt eine Hybridisierung von einheitlichen Oligonukleotiden mit detektierbaren Einheiten, z.B. Fluoreszenzfarbstoffen (MWG-Biotech) an die Marker-Komponente. In einem weiteren Beispiel haben Amino- oder Merkapto-Gruppen, beispielsweise 50 Aminogruppen pro Marker, die signalvermittelnde Funktion. Nach dem Einbau der Nuk-Makromoleküle in die Nukleinsäurekette erfolgt eine chemische Modifikation mit reaktiven Komponenten, z.B. mit Farbstoffen, wie beispielsweise für eingebaute Allyl-Amino-dUTP beschrieben, Diehl et al. Nucleic Acid Research, 2002, V. 30, Nr. 16 e79.

20 In einer anderen Ausführungsform hat die makromolekulare Marker-Komponente eine katalytische Funktion (in Form eines Enzyms oder Ribozyms). Dabei können unterschiedliche Enzyme verwendet werden, z.B. Peroxidase oder alkalische Phosphatase. Dank der Kopplung an die Nuk-Komponente kann das jeweilige Enzym durch den Einbau von Nuk-Makromolekülen an den Nukleinsäurestrang kovalent gebunden werden.

In einer weiteren Ausführungsform hat die makromolekulare Marker-Komponente eine Affinitätsfunktionalität zu einem anderen Molekül. Beispiele für solche Marker bilden Streptavidin-Moleküle, Antikörper oder Nukleinsäureketten, Beispiel 30 oder 32.

30 **1.3.4. Niedermolekularer Marker** - zum Stand der Technik gehörende Markierung von Nukleotiden beispielsweise mit ein oder zwei Biotin-Molekülen, ein oder zwei Farbstoff-Molekülen, ein oder zwei Hapten-Molekülen (z.B. Digoxigenin).

35 **1.3.5. Konventionell modifiziertes Nukleotid** - ein Nukleotid mit einem Linker (durchschnittliche Länge zwischen 5 und 30 Atomen) und einem Marker. Üblicherweise

trägt ein konventionell modifiziertes Nukleotid einen niedermolekularen Marker, z.B. ein Farbstoff- oder ein Biotinmolekül.

Zu Demonstration der Tatsache, dass eine einfache Kombination aus einem konventionell modifizierten Nukleotid mit einem makromolekularen Marker zur

5 Aufhebung der Substrateigenschaften der Nukleotide führt, werden in dieser Anmeldung Nukleotide dargestellt, die zwar einen makromolekularen Marker aber einen kurzen Linker mit einer durchschnittlichen Länge von 5 bis 30 Atome tragen. Auch solche Nukleotide werden als konventionell modifizierte Nukleotide bezeichnet. Alleine die Kombination zwischen einem konventionell modifizierten

10 Nukleotid und einem makromolekularen Marker reicht erfindungsgemäß nicht aus, um Anforderungen der Definition der Nuk-Makromoleküle zu erfüllen.

Im Gegensatz dazu, können Nuk-Makromoleküle durch eine Kombination aus einer oder mehreren Nuk-Komponenten, entsprechend einem oder mehreren langen Linkern

15 und einem Marker definiert werden.

#### **1.3.6. Enzyme (Polymerasen)**

In einer Ausführungsform können die Nuk-Makromoleküle als Substrate für Enzyme eingesetzt werden. Polymerasen stellen in Anwendungen oft eingesetzte Enzyme, die

20 Nukleotide als Substrate verwenden. Sie werden im weiteren beispielhaft und stellvertretend für andere Nukleotid-umsetzende Enzyme betrachtet. Eine der zentralen Fähigkeit der Polymerasen besteht in kovalenten Kopplung von Nukleotid-Monomeren zu einem Polymer. Dabei kann die Synthese sowohl matrizen-abhängig (wie z.B. DNA-oder RNA-Synthese mit DNA- oder RNA-abhängigen Polymerasen) als auch matrizen-unabhängig, z.B. durch Terminale Transferasen ("J Sambrook "Molecular Cloning" 3. Ed. CSHL Press 2001).

25

Falls RNA als Substrat (z.B. mRNA) in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt wird, können handelsübliche RNA-abhängige DNA-Polymerasen eingesetzt werden, z.B. AMV-Reverse Transcriptase (Sigma), M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma), HIV-Reverse Transcriptase ohne RNase-Aktivität. Für bestimmte Anwendungen, können Reverse Transcriptasen von RNase-Aktivität weitgehend frei sein ("Molecular cloning" 1989, Ed. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory), z.B. bei mRNA-Makrierung für Hybridisierungsexperimente.

30

Falls DNA als Substrat (z.B. cDNA) verwendet wird, eignen sich als Polymerasen prinzipiell alle DNA-abhängigen DNA-Polymerasen mit oder ohne 3'-5' Exonuklease-Aktivität (DNA-Replication" 1992 Ed. A.Kornberg, Freeman and company NY), z.B.

35

modifizierte T7-Polymerase vom Typ "Sequenase Version 2" (Amersham Pharmacia Biotech), Klenow Fragment der DNA-Polymerase I mit oder ohne 3'-5' Exonukleaseaktivität (Amersham Pharmacia Biotech), Polymerase Beta verschiedenen Ursprungs (Animal Cell DNA Polymerases" 1983, Fry M., CRC Press Inc., kommerziell erhältlich bei Chimerx) thermostabile Polymerasen wie beispielsweise Taq-Polymerase (GibcoBRL), proHA-DNA-Polymerase (Eurogentec), Vent, Vent exo minus, Pfu, Thermosequenase, Pwo-Polymerase usw. (Promega).

Auch DNA-abhängige RNA-Polymerasen können verwendet werden, z.B. E.coli RNA-Polymerase, T7-RNA-Polymerase, SP6 RNA Polymerase.

Die Polymerasen können eine 3'- oder eine 5'-Exonuklease-Aktivität aufweisen und in bestimmten Anwendungen eingesetzt werden (z.B. bei real-time PCR).

In der Anmeldung werden DNA-abhängige DNA-Polymerasen als Beispiele für Polymerasen betrachtet.

#### **1.3.7. Spaltbare Verbindung** - Eine unter milden Bedingungen spaltbare

Verbindung. Diese Verbindung kann einen Abschnitt im Linker darstellen und kann an einer oder an mehreren Stellen spaltbar sein. Es kann sich um eine chemisch spaltbare Verbindung, wie z.B. eine Disulfid-, eine Ester-, eine Acetal-, eine Thioesterverbindung (Short WO 9949082, Tcherkassov WO 02088382) handeln. Es kann auch eine photochemisch spaltbare Verbindung, wie in (Rothschild WO 9531429) dargestellt sein. Es kann auch eine enzymatisch spaltbare Verbindung (beispielsweise eine Peptid- oder Polypeptide-Bindung, Odedra WO 0192284), spaltbar durch Peptidasen, eine Poly- oder Oligosaccharid-Bindung, spaltbar durch Disaccharidasen) sein, wobei die Spaltung durch ein spezifisches Enzym zwischen bestimmten Monomeren der spaltbaren Stellen stattfinden kann.

Mehrere Beispiele für spaltbare Verbindungen sind bekannt. Die Kopplung einer solchen Verbindung ist beispielsweise beschrieben in (Tcherkassov 02088382, Metzker et al. Nucleic Acid Research 1994, V.22, S. 4259, Canard et al. Gene, 1994, V. 148, 1, , Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642.).

Eine Spaltbare Verbindung kann ein Teil des Linkers sein oder die Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid bilden, oder die Verbindung zwischen der Linker-Komponente und der Makrer-Komponente, oder die Verbindung zwischen den Marker-Einheiten und der Kern-Komponente.

**1.3.8** DNA - Deoxyribonukleinsäure verschiedenen Ursprungs und unterschiedlicher Länge (z.B. Oligonukleotide, Polynukleotide, Plasmide, genomische DNA, cDNA, ssDNA, dsDNA)

5     **1.3.9** RNA - Ribonukleinsäure

**1.3.10** dNTP - 2'-deoxy-Nucleosid-Triphosphate, Substrate für DNA-Polymerasen und Reverse-Transkriptasen, z.B. dATP, dGTP, dUTP, dTTP, dCTP.

10    **1.3.11** NTP - Ribonukleosid-Triphosphate, Substrate für RNA-Polymerasen, UTP, CTP, ATP, GTP.

**1.3.12** Abkürzung "NT" wird auch bei der Längenangabe einer Nukleinsäuresequenz verwendet, z.B. 1.000 NT. In diesem Fall steht "NT" für Nukleosid-Monophosphate.

15

Im Text wird bei Abkürzungen die Mehrzahl durch Verwendung des Suffixes "s" gebildet, "NT" steht zum Beispiel für "Nukleotid", "NTs" steht für mehrere Nukleotide.

**1.3.13** NSK - Nukleinsäurekette. DNA oder RNA

20

**1.3.14** Gesamtsequenz - Summe aller Sequenzen im Ansatz, sie kann ursprünglich aus einer oder mehreren NSKs bestehen. Dabei kann die Gesamtsequenz Teile oder Äquivalente einer anderen Sequenz oder von Sequenz-Populationen darstellen (z.B. mRNA, cDNA, Plasmid-DNA mit Insert, BAC, YAC) und aus einer oder unterschiedlichen Spezies stammen.

25

**1.3.15** NSKF - Nukleinsäurekettenfragment (DNA oder RNA), das einem Teil der Gesamtsequenz entspricht, NSKFs - Nukleinsäurekettenfragmente. Die Summe der NSKFs bildet ein Äquivalent zur Gesamtsequenz. Die NSKFs können beispielsweise Fragmente von DNA- oder RNA-Gesamtsequenz sein, die nach einem Fragmentierungsschritt entstehen.

30

**1.3.16** Primerbindungstelle (PBS) - Teil der Sequenz in der NSK oder NSKF, an den der Primer bindet.

35

**1.3.17** Referenzsequenz - eine bereits bekannte Sequenz, zu der die Abweichungen in der zu untersuchenden Sequenz bzw. in den zu untersuchenden Sequenzen (z.B.

Gesamtsequenz) ermittelt werden. Als Referenzsequenzen können in Datenbanken zugängliche Sequenzen verwendet werden, wie z.B. aus der NCBI-Datenbank.

#### **1.3.18 T<sub>m</sub> - Schmelztemperatur**

5

**1.3.19 Sterisches Hindernis:** Sterisch anspruchsvolle Gruppe, die durch ihre chemische Struktur die Eigenschaften der mit dieser Gruppe gekoppelten Nukleotide so verändert, dass diese durch eine Polymerase in einer Extensionsreaktion nicht nacheinander eingebaut werden können. Eine an die Base gekoppelte sterisch anspruchsvolle Gruppe kann zur Behinderung der weiteren Synthese führen. Biotin, Digoxigenin und Fluoreszenzfarbstoffe wie Fluoreszein, Tetramethylrhodamine, Cy3-Farbstoff stellen Beispiele einer solchen sterisch anspruchsvollen Gruppe dar (Zhu et al. Cytometry 1997, v.28, S.206, Zhu et al. NAR 1994, v.22, S.3418, Gebeyehu et al., NAR 1987, v.15, S.4513, Wiemann et al. Analytical Biochemistry 1996, v.234, S.166, Heer et al. BioTechniques 1994 v.16 S.54)

10

15

#### **1.3.20 PNA - Peptide Nucleic Acid**



## 2. Detaillierte Beschreibung:

Die Erfindung beschreibt eine neue Klasse an modifizierten Nukleotiden. 1. Aspekt der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen mit der Struktur:

(Nuk-Linker)<sub>n</sub>-Marker

5

wobei:

Nuk - ein Nukleotid oder ein Nukleosid ist (Nuk-Komponente)

Linker - eine Linker-Komponente, die folgende Bestandteile einschließt:

10

a) Kopplungseinheit L - ein Teil des Linkers, das die Verbindung zwischen Nuk und dem Linkerrest darstellt

b) Polymer - ein Teil des Linkers, das ein wasserlösliches Polymer mit einer durchschnittlichen Länge zwischen 100 und 10.000 Atome ist

c) Kopplungseinheit T - ein Teil des Linkers, das die Verbindung zwischen dem Linkerrest und dem Marker darstellt

15

Marker - eine Marker-Komponente ist

n - eine ganze Zahl zwischen 1 und 100 ist

Ein weiterer Aspekt 2 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt (Fig. 3A):

20

Wobei:

Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren Modifikationen, wobei L die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente darstellt (Kopplungseinheit L) und X die Kopplungsstelle der Kopplungseinheit L an der Base ist

25

R<sub>1</sub> - ist H

R<sub>2</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen, NH<sub>2</sub>, SH oder geschützte OH-Gruppe

30

R<sub>3</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen, PO<sub>3</sub>, SH, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, O-R<sub>3-1</sub>, P(O)<sub>m</sub>-R<sub>3-1</sub> (m ist 1 oder 2 ist), NH-R<sub>3-1</sub>, S-R<sub>3-1</sub>, Si-R<sub>3-1</sub> wobei R<sub>3-1</sub> eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist, oder eine der folgenden Modifikationen einschließt: -CO-Y, -CH<sub>2</sub>-O-Y, -CH<sub>2</sub>-S-Y, -CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>, -CO-O-Y, -CO-S-Y, -CO-NH-Y, -CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, wobei Y ein Alkyl ist, beispielsweise (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub> wobei n zwischen 0 und 4 liegt, oder ein substituiertes Alkyl ist, beispielsweise mit Halogen, Hydroxy, Amino, Carboxy-Gruppen).

35

R<sub>4</sub> - ist H oder OH

$R_5$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, eine Monophosphat-Gruppe, oder eine Diphosphat-Gruppe, oder eine Triphosphat-Gruppe, oder eine Alpha-Thiotriphosphat-Gruppe ist.

5 Ein weiterer Aspekt 3 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt (Fig. 3B):

Wobei:

10 Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

$R_1$  - ist H

15  $R_2$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal,  $NH_2$ , SH oder geschützte OH-Gruppe

$R_3$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe O-  $R_{3-2}$ -L,  $P(O)_m$ -  $R_{3-2}$ -L, wobei m 1 oder 2 ist,  $NH$ - $R_{3-2}$ -L,  $S$ - $R_{3-2}$ -L,  $Si$ - $R_{3-2}$ -L oder, wobei  $R_{3-2}$  die Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid ist und L - die Kopplungseinheit des Linkers (L) ist.

20

$R_4$  - ist H oder OH

25  $R_5$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, eine Monophosphat-Gruppe, oder eine Diphosphat-Gruppe, oder eine Triphosphat-Gruppe, oder eine Alpha-Thiotriphosphat-Gruppe ist.

Ein weiterer Aspekt 4 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt (Fig. 3B):

30 Wobei:

Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

35  $R_1$  - ist H

$R_2$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal,  $NH_2$ , SH oder geschützte OH-Gruppe

$R_3$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal,  $PO_3$ , SH,  $NH_2$ , O-  $R_{3-1}$ ,  $P(O)_m$ -  $R_{3-1}$ , NH- $R_{3-1}$ , S- $R_{3-1}$ , Si- $R_{3-1}$  wobei  $R_{3-1}$  eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist und m 1 oder 2 ist.

5  $R_4$  - ist H oder OH

$R_5$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe O-  $R_{5-1}$ -L, oder  $P(O)_3$ -  $R_{5-1}$ -L (modifizierte Monophosphat-Gruppe), oder  $P(O)_3$ - $P(O)_3$ - $R_{5-1}$ -L (modifizierte Diphosphat-Gruppe)

10 oder  $P(O)_3$ - $P(O)_3$ - $P(O)_3$ -  $R_{5-1}$ -L (modifizierte Triphosphat-Gruppe), wobei  $R_{5-1}$  die Kopplungsstelle der Kopplungseinheit L an das Nukleotid ist und Kopplungseinheit L die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente ist.

15 Ein weiterer Aspekt 5 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 4, wobei Kopplungseinheit L folgende strukturelle Elemente einschließt:

$R_6$ -NH- $R_7$ ,  $R_6$ -O- $R_7$ ,  $R_6$ -S- $R_7$ ,  $R_6$ -SS- $R_7$ ,  $R_6$ -CO-NH- $R_7$ ,  $R_6$ -NH-CO- $R_7$ ,  $R_6$ -CO-O- $R_7$ ,  $R_6$ -O-CO- $R_7$ ,  $R_6$ -CO-S- $R_7$ ,  $R_6$ -S-CO- $R_7$ ,  $R_6$ -P(O)<sub>2</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -Si- $R_7$ ,  $R_6$ -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- $R_7$ ,

20  $R_6$ -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-B- $R_7$ ,

$R_6$ -(CH=CH)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -(A-CH=CH)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -(CH=CH-B)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -(CH=CH-CH<sub>2</sub>-B)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -A-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -(-CH=CH-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-B- $R_7$ ,

$R_6$ -(C≡C)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -(A-C≡C)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -(A-C≡C-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -(C≡C-B)<sub>n</sub>- $R_7$ ,

$R_6$ -(C≡C-CH<sub>2</sub>-B)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -A-C≡C-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- $R_7$ ,  $R_6$ -(-C≡C-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-B- $R_7$ ,

25  $R_6$ -(-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-B- $R_7$

wobei  $R_6$  - die Nuk-Komponente ist,  $R_7$  - der Linkerrest ist und A und B unabhängig folgende strukturelle Elemente einschließen: -NH-, -O-, -S-, -SS-, -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -P(O)<sub>2</sub>-, -Si-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, eine photolabile Gruppe, wobei n - gleich 1 bis 5 ist

30

Ein weiterer Aspekt 6 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 5, wobei die Linker-Komponente ein wasserlösliches Polymer einschließt.

35

Ein weiterer Aspekt 7 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 6, wobei die Linker-Komponente wasserlösliche Polymere unabhängig ausgewählt aus folgender Gruppe einschließt:

Polyethylen-glycol (PEG), Polysaccharide, Dextran, Polyamide, Polypeptide, Polyphosphate, Polyacetate, Poly(alkyleneglycole), Kopolymere aus Ethylenglycol und Propylenglycol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(x-Hydroxy-Säuren), Poly-Acrylsäure, Poly-Acrylamid, Poly(Vinylalkohol).

Ein weiterer Aspekt 8 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 7, wobei die Linker-Komponente eine durchschnittliche Länge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10000, 10000 bis 100000 Atomen hat.

Ein weiterer Aspekt 9 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 8, wobei eine Marker-Komponente eine signalgebende, signalvermittelnde, katalytische oder affine Funktion hat

Ein weiterer Aspekt 10 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente aus einer strukturellen Marker-Einheit besteht

Ein weiterer Aspekt 11 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente aus mehreren strukturellen Marker-Einheiten gebunden an eine Kern-Komponente besteht

Ein weiterer Aspekt 12 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 10 oder 11, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden strukturellen Elemente einschließt:

Biotin, Hapten, radioaktives Isotop, seltenes Erdenelement, Farbstoff, Fluoreszenzfarbstoff.

Ein weiterer Aspekt 13 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 10 oder 11, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt:

Nanokristalle oder deren Modifikationen, Proteine oder deren Modifikationen, Nukleinsäureketten oder deren Modifikationen, Teilchen oder deren Modifikationen.

Ein weiterer Aspekt 14 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eines der folgenden Proteine einschließt:

- 5 Enzyme oder deren Konjugate oder Modifikationen,  
Antikörper oder deren Konjugate oder Modifikationen,  
Streptavidin oder seine Konjugate oder Modifikationen,  
Avidin oder seine Konjugate oder Modifikationen

10 Ein weiterer Aspekt 15 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eine der folgenden Arten Nukleinsäureketten einschließt: DNA, RNA, PNA, wobei die Länge von Nukleinsäureketten zwischen 10 und 10.000 Nukleotiden oder deren Äquivalente liegt.

15 Ein weiterer Aspekt 16 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 11 bis 15, wobei die Kern-Komponente der Marker-Komponente unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt: wasserlöslichen Polymer unabhängig ausgewählt aus der Gruppe von: Polyamide (z.B. Polypeptide), Poly-Acrylsäure und deren Derivate, Poly-Acrylamide und deren Derivate, Poly-Vinylalkohole und deren Derivate, Nukleinsäureketten und deren Derivate, Streptavidin oder Avidin und deren Derivate, Dendrimere, wobei einzelne Polymere linear oder verzweigt oder unter einander vernetzt sein können

20

25 Ein weiterer Aspekt 17 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, 11 bis 16, wobei die Verbindung zwischen mehreren strukturellen Marker-Einheiten und der Kern-Komponente kovalent oder affine erfolgt.

30 Ein weiterer Aspekt 18 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 10, wobei die Verbindung zwischen einer strukturellen Marker-Einheit und dem Linker kovalent oder affine erfolgt.

35 Ein weiterer Aspekt 19 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, 11 bis 17, wobei die Verbindung zwischen der Kern-Komponente und dem Linker kovalent oder affine erfolgt

Ein weiterer Aspekt 20 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt.

Ein weiterer Aspekt 21 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 20, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und die Linker-Komponente eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

Ein weiterer Aspekt 22 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 21, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, dass nur eine Nuk-Komponente in einen wachsenden Strang eingebaut werden kann.

Ein weiterer Aspekt 23 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt sind, wobei die Länge der jeweiligen Linker-Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt.

Ein weiterer Aspekt 24 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, 23, wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker-Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und der jeweilige Linker eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

Ein weiterer Aspekt 25 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, 23, 24, wobei mehrere Nuk- Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker- Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker- Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, dass nur eine Nuk-Komponente in eine wachsende Nukleinsäurekette eingebaut werden kann.

Ein weiterer Aspekt 26 der Erfindung betrifft Oligonucleotide oder Polynucleotide die mindestens ein Nuk-Makromolekül nach Aspekten 1 bis 25 pro eine Nukleinsäurekette einschließen.

Ein weiterer Aspekt 27 der Erfindung betrifft Oligonucleotide oder Polynucleotide nach Aspekt 26, wobei Oligo- oder Polynucleotide RNA, DNA oder PNA sind, deren Länge zwischen 5 und 50.000 Nukleotide beträgt.

Ein weiterer Aspekt 28 der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Modifizierung von Nukleinsäureketten, wobei für die Kopplung Nuk-Makromoleküle nach Aspekten 1 bis 25 verwendet werden

Ein weiterer Aspekt 29 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Aspekten 1 bis 25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt
- mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,
- mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten,

Ein weiterer Aspekt 30 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Aspekten 1-25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt
- mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,

- mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten
- mindestens eine weitere Art von Nukleosidtriphosphaten

5 Ein weiterer Aspekt 31 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 29, 30, wobei die Enzymart unabhängig eine der folgenden Gruppen einschließt: DNA-Polymerase, RNA-Polymerase, Terminale Transferase,

10 Ein weiterer Aspekt 32 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 30, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: Ribo-Nukleosidtriphosphaten (ATP, GTP, UTP, CTP), von 2'-Deoxyribonukleosid-Triphosphaten (dATP, dUTP, dTTP, dCTP, dGTP), von 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddATP, ddGTP, ddUTP, ddCTP, ddTTP).

15 Ein weiterer Aspekt 33 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 32, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten konventionell modifizierte Nukleotide mit einer Markierung sind, wobei diese Markierung unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Biotin, ein Hapten, ein radioaktives Element.

20 Ein weiterer Aspekt 34 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 33, wobei mindestens zwei unterschiedliche Populationen an Nukleinsäureketten präsent sind

25 Ein weiterer Aspekt 35 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 34, wobei mindestens eine der Populationen der Nukleinsäureketten eine Primer-Funktion hat und mindestens eine Population der Nukleinsäureketten eine Matrizen-Funktion.

30 Ein weiterer Aspekt 36 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 28, wobei die Modifizierung durch eine chemische Kopplung erfolgt, wobei die Kopplung der Nuk-Makromoleküle an Nukleinsäureketten durch Phosphoroamidit-Kopplung erfolgt.



Ein weiterer Aspekt 37 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die die Kopplung nur einer einzigen Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäure-Strang zulassen und der mehrfache Einbau durch Modifikationen an der Nuk-Komponente, und/oder der Linker-Komponente und/oder der Marker-Komponente verhindert wird.

Ein weiterer Aspekt 38 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 37, wobei die weitere Kopplung reversibel verhindert wird.

Ein weiterer Aspekt 39 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 37, wobei die weitere Kopplung irreversibel verhindert wird.

Ein weiterer Aspekt 40 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die eine Kopplung mehrerer Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäurestrang zulassen

Ein weiterer Aspekt 41 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28-40, wobei die an der Reaktion teilnehmenden Nukleinsäureketten an eine feste Phase gekoppelt sind und adressierbare Positionen haben.

Ein weiterer Aspekt 42 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 41, wobei die Nukleinsäureketten eine einheitliche Population darstellen

Ein weiterer Aspekt 43 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 41, wobei die Nukleinsäureketten zwei oder mehrere unterschiedliche Populationen darstellen und jede der Populationen eine adressierbare Position auf der festen Phase hat

Ein weiterer Aspekt 44 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

Ein weiterer Aspekt 45 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der in den wachsenden Nukleinsäurestrang eingebauten Nuk-Komponente abgetrennt wird.

Ein weiterer Aspekt 46 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen jeweils unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

Ein weiterer Aspekt 47 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der Nuk-Komponente abgetrennt wird.

Ein weiterer Aspekt 48 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen auf der festen Phase als Spots auf einer planen Oberfläche verteilt sind, wobei pro ein Spot Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

Ein weiterer Aspekt 49 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen an den Kügelchen bzw. Partikel befestigt sind, wobei pro ein Kügelchen Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

Ein weiterer Aspekt 50 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen in einem Multigefäßsystem, wie Mikrotiterplatte oder Nanotiterplatte oder Pikotiterplatte, verteilt sind, wobei in einem Gefäß des Multigefäßsystems die Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

Ein weiterer Aspekt 51 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 35 und 37 bis 50, das folgende Schritte einschließt:

- 10 a) Bereitstellung mindestens einer Population an einzelsträngigen Nukleinsäureketten
  - b) Hybridisierung von sequenzspezifischen Primern an diese Nukleinsäureketten, wobei extensionsfähige NSK-Primer-Komplexe entstehen
  - 15 c) Inkubation von mindestens einer Art der Nuk-Makromoleküle nach Aspekten 1 bis 25 zusammen mit einer Art der Polymerase nach Aspekt 31 mit den in Schritten a und b bereitgestellten NSK-Primer-Komplexen unter Bedingungen, die den Einbau von komplementären Nuk-Makromolekülen zulassen, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt.
  - 20 d) Entfernung der nicht eingebauten Nuk-Makromoleküle von den NSK-Primer-Komplexen
  - e) Detektion der Signale von in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
  - 25 f) Entfernung der Linker-Komponente und der Marker-Komponente von den in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
  - g) Waschen der NSK-Primer-Komplexe
- gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (c) bis (g),

30 Ein weiterer Aspekt 52 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28-40, wobei die Nukleinsäureketten an eine feste Phase in zufälliger Anordnung gekoppelt sind.

Ein weiterer Aspekt 53 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 41, 52 zur parallelen Sequenzanalyse von Nukleinsäuresequenzen (Nukleinsäureketten, NSKs), bei dem man

Fragmente (NSKFs) einzelsträngiger NSKs mit einer Länge von etwa 50 bis 1000 Nukleotiden erzeugt, die überlappende Teilsequenzen einer Gesamtsequenz darstellen können, man

5 die NSKFs unter Verwendung eines einheitlichen oder mehrerer unterschiedlichen Primer in Form von NSKF-Primer-Komplexen auf einer Reaktionsoberfläche in einer zufälligen Anordnung bindet, wobei die Dichte der an die Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine optische Detektion der Signale von einzelnen eingebauten Nuk-Makromolekülen  
10 zuläßt, man

eine zyklische Aufbaureaktion des komplementären Stranges der NSKFs unter Verwendung einer oder mehrerer Polymerasen durchführt, indem man

15 a) zu den auf der Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine Lösung zugibt, die eine oder mehrere Polymerasen und ein bis vier Nuk-Makromoleküle enthält, die eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Marker-Komponente haben, wobei die bei gleichzeitiger Verwendung von mindestens zwei Nuk-Makromoleküle jeweils an die Marker-Komponente befindlichen  
20 Fluoreszenzfarbstoffe so gewählt sind, dass sich die verwendeten Nuk-Makromoleküle durch Messung unterschiedlicher Fluoreszenzsignale voneinander unterscheiden lassen, wobei die Nuk-Makromoleküle strukturell so modifiziert sind, dass die Polymerase nach Einbau eines solchen Nuk-Makromoleküls in einen wachsenden komplementären Strang nicht in der  
25 Lage ist, ein weiteres Nuk-Makromolekül in denselben Strang einzubauen, wobei die Linker-Komponente mit der Marker-Komponente abspaltbar sind, man

30 b) die in Stufe a) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen inkubiert, die zur Verlängerung der komplementären Stränge geeignet sind, wobei die komplementären Stränge jeweils um ein Nuk-Makromolekül verlängert werden, man

35 c) die in Stufe b) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung nicht in einen komplementären Strang eingebauter Nuk-Makromoleküle geeignet sind, man

d) die einzelnen, in komplementäre Stränge eingebauten Nuk-Makromoleküle durch Messen des für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Signals detektiert, wobei man gleichzeitig die relative Position der einzelnen Fluoreszenzsignale auf der Reaktionsoberfläche bestimmt, man

e) zur Erzeugung unmarkierter (NTs oder) NSKFs die Linker-Komponente und die Marker-Komponente von den am komplementären Strang angefügten Nuk-Komponenten abspaltet, man

f) die in Stufe e) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung der Marker-Komponente geeignet sind, man

die Stufen a) bis f) gegebenenfalls mehrfach wiederholt,

wobei man die relative Position einzelner NSF-Primer-Komplexe auf der Reaktionsoberfläche und die Sequenz dieser NSFs durch spezifische Zuordnung der in Stufe d) in aufeinanderfolgenden Zyklen an den jeweiligen Positionen detektierten Fluoreszenzsignale zu den Nuk-Makromolekülen bestimmt.

Ein weiterer Aspekt 54 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus nur jeweils eine Art der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

Ein weiterer Aspekt 55 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

Ein weiterer Aspekt 56 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils vier unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

Ein weiterer Aspekt 57 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass die NSKs Varianten einer bekannten Referenzsequenz sind und man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in den Zyklen abwechselnd jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle und zwei unmarkierte NTs einsetzt und man die Gesamtsequenzen durch Vergleich mit der Referenzsequenz ermittelt.

Ein weiterer Aspekt 58 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach den Aspekten 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man in die NSKFs jeweils eine Primerbindungsstelle (PBS) einführt, wobei man bei doppelsträngigen NSKs an beiden komplementären Einzelsträngen jeweils eine PBS einführt und wobei die Primerbindungsstellen für alle NSKFs jeweils gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.

Ein weiterer Aspekt 59 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach den Aspekten 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs mit Primern in einer Lösung unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen, und man die gebildeten NSKF-Primer-Komplexe anschließend auf der Reaktionsoberfläche bindet.

Ein weiterer Aspekt 60 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach den Aspekten 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs zunächst auf der Reaktionsoberfläche immobilisiert und erst anschließend mit Primern unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei NSKF-Primer-Komplexe gebildet werden, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.

Ein weiterer Aspekt 61 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 53 bis 60, bei dem an 10 bis 100.000 unterschiedlichen Sequenzpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt

Ein weiterer Aspekt 62 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 53 bis 60, bei dem an 100.000 bis 100.000.000 unterschiedlichen Sequenzpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt.

Ein weiterer Aspekt 63 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 62, wobei die Sequenzen der Nukleinsäureketten ermittelt werden

Ein weiterer Aspekt 64 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 63, wobei die Marker-Komponente fluoreszent markiert ist

Ein weiterer Aspekt 65 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 64, wobei die feste Phase unabhängig aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Silicon, Glas, Keramik, Kunststoffe, Gele oder deren Modifikationen

Im weiteren Aspekt 66 der Erfindung sind besonders bevorzugt makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt, Fig. 3A:

Wobei:

Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren Modifikationen, wobei L die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente darstellt (Kopplungseinheit L) und X die Kopplungsstelle der Kopplungseinheit L an der Base ist, wobei die Kopplungsstelle an Pyrimidinbasen an der 5-Position oder 4-Position am Pyrimidinring ist und an der 7-Position der Deazapurine.

$R_2$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, oder geschützte OH-Gruppe

$R_3$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH,  $NH_2$ ,

$R_4$  - ist H oder OH

$R_5$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, oder Monophosphat-Gruppe, oder Diphosphat-Gruppe oder Triphosphat-Gruppe

Ein weiterer Aspekt 67 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 66, wobei die Kopplungseinheit L folgende strukturelle Elemente einschließt:

$R_6-NH-R_7$ ,  $R_6-O-R_7$ ,  $R_6-S-R_7$ ,  $R_6-SS-R_7$ ,  $R_6-CO-NH-R_7$ ,  $R_6-NH-CO-R_7$ ,  $R_6-CO-O-R_7$ ,

$R_6-O-CO-R_7$ ,  $R_6-CO-S-R_7$ ,  $R_6-S-CO-R_7$ ,  $R_6-P(O)_2-R_7$ ,  $R_6-Si-R_7$ ,  $R_6-(CH_2)_n-R_7$ ,

$R_6-(CH_2)_n-R_7$ ,  $R_6-A-(CH_2)_n-R_7$ ,  $R_6-(CH_2)_n-B-R_7$ ,

$R_6-(CH=CH-)_n-R_7$ ,  $R_6-(A-CH=CH-)_n-R_7$ ,  $R_6-(CH=CH-B-)_n-R_7$ ,

$R_6-A-CH=CH-(CH_2)_n-R_7$ ,  $R_6-(-CH=CH-CH_2-)_n-B-R_7$ ,

$R_6-(C\equiv C-)_n-R_7$ ,  $R_6-(A-C\equiv C-)_n-R_7$ ,  $R_6-(C\equiv C-B-)_n-R_7$ ,  
 $R_6-A-C\equiv C-(CH_2-)_n-R_7$ ,  $R_6-(-C\equiv C-CH_2-)_n-B-R_7$ ,

wobei  $R_6$  - die Nuk-Komponente ist,  $R_7$  - der Linkerrest ist und A und B folgende  
strukturelle Elemente einschließen: -NH-, -O-, -S-, -SS-, -CO-NH-, -NH-CO-, -  
CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -P(O)<sub>2</sub>-, -Si-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, eine photolabile Gruppe,  
wobei n - gleich 1 bis 5 ist

Ein weiterer Aspekt 68 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen  
nach Aspekt 66, wobei die Linker-Komponente ein wasserlösliches Polymer  
einschließt.

Ein weiterer Aspekt 69 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen  
nach Aspekt 68, wobei die Linker-Komponente wasserlösliche Polymere  
unabhängig ausgewählt aus folgender Gruppe einschließt:

Polyethylen-glycol (PEG), Polysaccharide, Dextran, Polyamide, Polypeptide,  
Polyphosphate, Polyacetate, Poly(alkyleneglycole), Kopolymere aus Ethylenglycol  
und Propylenglycol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone),  
Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(x-  
Hydroxy-Säuren), Poly-Acrylsäure, Poly-Acrylamid, Poly(Vinylalkohol).

Ein weiterer Aspekt 70 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen  
nach Aspekten 66 bis 69, wobei eine Linker-Komponente eine durchschnittliche  
Länge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis  
2000, 2000 bis 10000, 10000 bis 100000 Atome hat.

Ein weiterer Aspekt 71 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen  
nach Aspekten 66 bis 69, wobei eine Marker-Komponente eine signalgebende,  
signalvermittelnde, katalytische oder affine Funktion hat

Ein weiterer Aspekt 72 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen  
nach Aspekten 66 bis 69, wobei eine Marker-Komponente aus einer strukturellen  
Marker-Einheit besteht

Ein weiterer Aspekt 73 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen  
nach Aspekten 66 bis 69, wobei eine Marker-Komponente aus mehreren  
strukturellen Marker-Einheiten gebunden an eine Kern-Komponente besteht



Ein weiterer Aspekt 74 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 72 oder 73, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden strukturellen Elemente einschließt:

5 Biotin, Hapten, radioaktives Isotop, seltene Erdenatom, Farbstoff, Fluoreszenzfarbstoff.

Ein weiterer Aspekt 75 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 72 oder 73, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt:

10 Nanokristalle oder deren Modifikationen, Proteine oder deren Modifikationen, Nukleinsäureketten oder deren Modifikationen, Teilchen oder deren Modifikationen.

15 Ein weiterer Aspekt 76 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 75, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eines der folgenden Proteine einschließt:

Enzyme oder deren Konjugate und Modifikationen,  
Antikörper oder deren Konjugate und Modifikationen,  
20 Streptavidin oder seine Konjugate und Modifikationen,  
Avidin oder seine Konjugate oder Modifikationen

Ein weiterer Aspekt 77 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 75, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eine der folgenden Arten Nukleinsäureketten einschließt: DNA, RNA, PNA, wobei die Länge von Nukleinsäureketten zwischen 10 und 10.000 Nukleotide liegt

25

Ein weiterer Aspekt 78 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 73 bis 77, wobei die Kern-komponente der Marker-Komponente unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt: wasserlöslichen Polymer aus der Gruppe von: Polyamide (z.B. Polypeptide), Poly-Acrylsäure und deren Derivate, Poly-Acrylamide und deren Derivate, Poly-Vinylalkohole und deren Derivate, Nukleinsäuren und deren Derivate, Streptavidin oder Avidin und deren Derivate, Dendrimere, wobei diese Elemente linear oder verzweigt oder unter  
30  
35 einander vernetzt sein können

Ein weiterer Aspekt 79 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 71, 73 bis 78, wobei die Verbindung zwischen mehreren strukturellen Marker-Einheiten und der Kern-Komponente kovalent oder affine erfolgt.

5

Ein weiterer Aspekt 80 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 73, wobei die Verbindung zwischen einer strukturellen Marker-Einheit und dem Linker kovalent oder affine erfolgt

10

Ein weiterer Aspekt 81 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 71, 73 bis 78, wobei die Verbindung zwischen der Kern-Komponente und dem Linker kovalent oder affine erfolgt

15

Ein weiterer Aspekt 82 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 81, wobei nur eine Nuk- Komponente mit einem gekoppelten Linker an die Marker-Komponente gekoppelt ist

20

Ein weiterer Aspekt 83 der Erfindung betrifft eine Makromolekulare Verbindung nach Aspekten 66 bis 82, wobei nur eine Nuk- Komponente mit einem gekoppelten Linker an die Marker-Komponente gekoppelt ist, wobei der Linker eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

25

Ein weiterer Aspekt 84 der Erfindung betrifft eine Makromolekulare Verbindung nach Aspekten 66 bis 82, wobei nur eine Nuk- Komponente mit einem gekoppelten Linker an die Marker-Komponente gekoppelt ist, wobei ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, dass nur eine Nuk-Komponente in einen wachsenden Strang eingebaut werden kann.

30

Ein weiterer Aspekt 85 der Erfindung betrifft eine Makromolekulare Verbindung nach Aspekten 66 bis 71, 73 bis 82, wobei mehrere Nuk- Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt

35

Ein weiterer Aspekt 86 der Erfindung betrifft eine Makromolekulare Verbindung nach Aspekten 66 bis 71, 73 bis 82, wobei mehrere Nuk- Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt, wobei der jeweilige Linker eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

Ein weiterer Aspekt 87 der Erfindung betrifft eine Makromolekulare Verbindung nach Aspekten 66 bis 71, 73 bis 82, wobei mehrere Nuk- Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker- Komponenten gekoppelt, wobei ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, dass nur eine Nuk-Komponente in eine wachsende Nukleinsäurekette eingebaut werden kann.

Ein weiterer Aspekt 88 der Erfindung betrifft Oligonucleotide oder Polynucleotide die mindestens ein Nuk-Makromolekül nach Aspekten 66 bis 87 pro eine Nukleinsäurekette einschließen.

Ein weiterer Aspekt 89 der Erfindung betrifft Oligonucleotide oder Polynucleotide nach Aspekt 88, wobei Oligo- oder Polynucleotide RNA, DNA oder PNA sind, deren Länge zwischen 5 und 50.000 Nukleotide beträgt.

## **15    Gegenüberstellung von Eigenschaften konventionell modifizierter Nukleotide und Nuk-Makromoleküle:**

### **Substrateigenschaften der konventionell modifizierten Nukleotide**

Der Einfluß unterschiedlicher Linkergrößen, der chemischen Linkerzusammensetzung und die unterschiedlicher Größe und Beschaffenheit von niedermolekularen Markern auf die Substrat-Eigenschaften der Nukleotide (G. Wright et al. Pharmac.Ther. 1990, V. 47, S. 447, Klevan US Patent 4828979, Lee. et al. Nucleic Acid Research 1992, V. 20, 2471, J. Brandis Nucleic Acid Research, 1999, V.27, 1912 ) macht deutlich, dass bereits geringfügige Veränderungen an der Nukleotid- , Linker- und Marker-Struktur zu einer starken Veränderung der Substrateigenschaften der modifizierten Nukleotide führen können.

Folgerichtig läßt sich nachweisen, dass die Kopplung eines deutlich größeren Moleküls (z.B. eines Proteins) an ein konventionell modifiziertes Nukleotid zur Aufhebung von dessen Substrateigenschaften führt, s. Beispiel 34B.

Aus diesem Grund konnten bis jetzt signalverstärkende Makromoleküle nur nach erfolgtem enzymatischem Einbau der Nukleotide in die Nukleinsäurekette mit dem Nukleotid gekoppelt werden, wie beispielsweise markiertes Streptavidin an biotinylierte Nukleotide.

Ähnliches lässt sich feststellen, wenn Nukleotid-Monomere in einer Nukleinsäurekette betrachtet werden: nur niedermolekulare Stoffe können beispielsweise an ein

Oligonukleotid in der Nähe der 3'-OH-Position gekoppelt werden, falls dieses Oligonukleotid als Primer in weiteren Reaktionen auftreten sollte. Zu große Moleküle, z.B. Streptavidin, gekoppelt an ein Nukleotid-Monomer am 3'-Ende oder in der Nähe des 3'-Endes eines Oligonukleotids führen zum Verlust der Primereigenschaften. Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden sein zu wollen, kann dies beispielsweise durch sterische Einflüsse der Makromoleküle erklärt werden. Die räumlichen Verhältnisse im aktiven Zentrum vieler Enzyme sind sehr anspruchsvoll und der katalytische Mechanismus vieler Enzyme schließt komplexe konformationelle Änderungen der Enzym-Struktur selber sowie die der Substrate (Nukleotid-Monomere). In vielen Fällen führen auch nur geringfügige chemische Modifikationen an Nukleotid-Monomeren, die als Monomere einer Polymer-Kette auftreten, zu einer veränderten enzymatischen Akzeptanz der Nukleinsäureketten. Ein Beispiel dafür ist die alpha-thiophosphonat-Modifikation der Nukleotid-Monomere, die zur Exonuklease-Resistenz der Nukleinsäurekette führt.

Auch wenn eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen einen breiten Einsatz in der modernen Diagnostik und Forschung gefunden hat, besteht nach wie vor ein dringender Bedarf nach Signalverstärkung der biologisch aktiven markierten Molekülen. Man bedient sich oft einer sekundären Signalverstärkung durch Enzymreaktionen.

Trotz der naheliegenden Überlegung, eine mehrfache Markierung in Form einer makromolekularen Marker-Komponente an Nukleotide zu koppeln, gelang es noch nicht, diesen Schritt durch einfache Kombination zwischen konventionellen Nukleotidstrukturen und einer makromolekularen Marker-Komponente unter Beibehaltung der Substrateigenschaft der Nukleotide zu realisieren.

Die Masse der konventionell modifizierten Nukleotide liegt im Wesentlichen im selben Bereich wie bei nicht modifizierten Nukleotiden, und ist relativ gering verglichen mit der Masse von Proteinen, wie z.B. Streptavidin oder Polymerasen. Die Steigerung der Masse des Nukleotids durch Einführung makromolekularer Komponenten kann zu Veränderung von biochemischen und physikalischen Eigenschaften von Nukleotiden führen.

Die Überwindung dieses Nachteils des Standes der Technik gelang überraschenderweise durch die Einführung einer wesentlich längeren Linker-Komponente zwischen der Nuk- Komponente und der Marker- Komponente, als es vom Stand der Technik bekannt war.

Überraschenderweise behalten die erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle ihre Substrataktivität trotz der massiven Veränderungen in ihren Eigenschaften bei und können von Enzymen verwendet als Substrate werden. So bauen beispielsweise Polymerasen die erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle in den wachsenden Strang ein. Terminale deoxy-Nucleotidyl-Transferase (TdT) können Nuk-Makromoleküle an ein 3'-Ende einer Nukleinsäure koppeln (Beispiel 34B,C und Beispiel 35).

Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, dass die Masse der erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle ein vielfaches der natürlichen Nukleotide bildet und einen großen Einfluß auf die Nuk- Komponente ausübt.

#### **Einsatzgebiete der Nuk-Makromoleküle:**

Die Kopplung eines makromolekularen Markers an ein Substrat für Enzyme, an ein Nukleotid, bietet die Möglichkeit eines breiten Einsatzes dieser Nuk-Makromoleküle in unterschiedlichen Anwendungen in der Biotechnologie, Medizin und Wissenschaft.

Erfindungsgemäß können Nuk-Makromoleküle in Verfahren eingesetzt werden, bei denen Sie als Substrate für Enzyme dienen.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden Nuk-Makromoleküle in den Verfahren zur Markierung von Nukleinsäuren eingesetzt. Dabei erfolgt eine Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen nach allgemeinen Regeln der enzymatischen Verlängerungsreaktion von Nukleinsäureketten, ("Molecular Cloning", J. Sambrook, 3. Ed. 2001).

Der große Vorteil eines makromolekularen Markers pro ein eingebautes Nukleotid liegt in einer wesentlich höheren Signalstärke im Vergleich zu herkömmlichen modifizierten Nukleotiden.

Ein weiterer Vorteil ist die große Distanz des Markers zum Nukleinsäurestrang, so dass nur geringfügige Wechselwirkung zwischen dem Marker und dem Nukleinsäurestrang zu erwarten sind. Dies hat einen Einfluß beispielsweise auf die Fluoreszenzeigenschaften der Marker: Die Fluoreszenz der Marker wird von den Nukleobasen (Purine und Pyrimidine) nicht gequencht. Falls mehrere Nuk-Makromoleküle in einer Nukleinsäurekette eingebaut sind, führt eine größere Distanz zwischen dem Marker und der Nukleotid-Komponenten zu einer deutlichen Verminderung der Interaktion zwischen Markern von benachbarten Nukleotiden.

Erfolgt die Markierung einer Nukleinsäurekette beispielsweise während der enzymatischen Synthese dieser Kette durch den Einbau von Nuk-Makromolekülen, so sind unter Umständen keine weiteren mehrstufigen Signalamplifikationsschritte mehr notwendig. Viele der bekannten Signalamplifikationsschritte, z.B. Biotin-Streptavidin-Antikörper, oder Digoxigenin-Antikörper I -Antikörper II laufen mit nur mäßigen Ausbeuten ab, wie z.B. Signalamplifikationen bei FISH-Analysen. Schwankende und schwache Ausbeuten in der Markierung verursachen ebenfalls Schwankungen und Schwäche im Signal, was zu Fehlinterpretationen führen kann. Durch den Einsatz von Nuk-Makromolekülen kann die Schwäche der Markierung beseitigt werden. Durch den Einsatz von Nuk-Makromolekülen mit konstanten Signalmengen können auch die Schwankungen weitgehend ausgeglichen werden.

Die Markierung von Nukleinsäuren kann in unterschiedlichen Verfahren eingesetzt werden. Die konkreten Bedingungen der Nukleinsäurevorbereitung, die Reihenfolge der enzymatischen Schritte und Detektionsvorgänge hängen im einzelnen vom Verfahren ab, in dem die Markierung eingesetzt wird.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle eine überdurchschnittliche Verbesserung der Markierungsstrategien der Nukleinsäureketten ermöglichen.

### **Modifizierte Nukleinsäureketten**

In einer Ausführung der Erfindung schließen Nukleinsäureketten Nuk-Komponenten der Nuk-Makromoleküle als Einheiten der Kette ein. Die Nuk-Makromoleküle werden als Monomere einer Polymerkette, der Nukleinsäurekette, betrachtet. Solche Nukleinsäureketten mit integrierten Nuk-Makromolekülen können als Sonden und als Reaktionspartner in verschiedenen Bereichen eingesetzt werden (z.B. Real-Time-PCR, Ligase-Ketten-Reaktion).

In einer Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül an das 5'-Ende der Nukleinsäurekette integriert. In einer Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül an das 3'-Ende der Nukleinsäurekette integriert. In einer weiteren Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül im Inneren der Nukleinsäurekette integriert, wobei der Abstand vom am nächsten liegenden Kettenende in folgenden Bereichen liegt (Zahl der Monomeren der Kette bis zum nächsten Kettenende): 1 bis 2, 2 bis 4, 4 bis 8, 8 bis 15, 15 bis 30, 30 bis 100, 100 bis 500.

Ein Nuk-Makromolekül kann mehrere Nuk-Komponente einschließen. In einer Ausführungsform wird nur eine Nuk-Komponente eines Nuk-Makromoleküls in eine

Nukleinsäurekette integriert, die anderen Nuk-Komponenten liegen in Monomer-Form vor. In einer anderen Ausführungsform können mehrere Nuk-Komponenten eines Nuk-Makromoleküls in unterschiedliche Nukleinsäureketten integriert werden, wobei die Nukleinsäureketten unter einander identische oder auch unterschiedliche Sequenzen aufweisen können.

Besonders vorteilhaft ist der Einsatz mit Nuk-Makromolekülen modifizierter Nukleinsäureketten dann, wenn Nuk-Makromolekül als Teil einer Polymer-Kette an einer enzymatischen Reaktion / Umwandlung teilnimmt oder sich in unmittelbarer Nähe vom an der Reaktion teilnehmenden Nukleotid befindet. Durch den langen Linker der Nuk-Makromolekülen wird der Einfluß einer makromolekularen Marker-Komponente auf das Enzym stark reduziert, so dass die modifizierten Nukleotid-Komponenten an den enzymatischen Reaktionen (z.B. Primer-Funktion bei einer matrizen-abhängigen, polymerase-gesteuerten Reaktion, bei einer Ligase-abhängigen Reaktion (z.B. Ligase-Ketten-Reaktion), 3'-Exonuklease oder 5'-Exonuklease-Aktivitäten verschiedener Enzyme, Endonuklease-Spaltung, ) teilnehmen können, bzw. die Reaktion an benachbarten Nukleotiden nicht beeinträchtigen (J. Wilhelm "Entwicklung Real-Time-PCR-basierter Methoden für die moderne DNA-Analytik" Dissertation, 2003, Gießen, S. Meuer "Rapid cycle real time PCR", Springer 2004, ISBN 3-540-66736-9, T. Weissensteiner "PCR-Technology: current innovations" CRC Press 2004 ISBN 0-8493-1184-5). Der Abstand zwischen der Position des Nuk-Makromoleküls in der Nukleinsäurekette und dem Nukleotid derselben Nukleinsäurekette, das als Substrat an der enzymatischen Reaktion teilnimmt, liegt beispielsweise in folgenden Bereichen (Zahl von Nukleotiden): 0 bis 3, 3 bis 6, 6 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 40. Zahl 0 bedeutet, dass das Nuk-Makromolekül direkt an das an der Reaktion teilnehmende Nukleotid gekoppelt ist.

Im weiteren folgen einige Beispiele zum Einsatz der Nuk-Makromoleküle.

### **Verfahren in der Flüssigphase**

In einer Ausführungsform der Markierungsverfahren befinden sich die zu markierenden Nukleinsäureketten in der Flüssigphase, s. Beispiel 34, 35. Viele andere Verfahren, z.B. PCR, Transkription ("Molecular Cloning", J. Sambrook, 3. Ed. 2001) können mit erfindungsgemäßen Nuk-Makromolekülen durchgeführt werden. Dabei werden Nuk-Makromoleküle ähnlich zu konventionell mit Farbstoff modifizierten Nukleotiden in die Reaktion zugegeben. Allgemeine Regeln der Verwendung konventionell modifizierter Nukleotide, wie beispielsweise dCTP-Cy3 (Amersham

Bioscience) oder dUTP-TMR (NEN) sind ausführlich in Literatur beschrieben ("Molecular Cloning", J. Sambrook, 3. Ed. 2001).

Beispielsweise kann für die Kopplung eines einzelnen komplementären Nukleotids an den Primer eine Art der Nuk-Makromoleküle, z.B. dATP oder dCTP, verwendet werden.

5 Bei den meisten Reaktionen werden allerdings Gemische aus modifizierte und nicht modifizierten Nukleotiden eingesetzt (H. Yu et al. *Nucleic Acid Research* 1994, v. 22 3226-, "Molecular Cloning", J. Sambrook, 3. Ed. 2001). Beispielsweise können nicht markierte und markierte Nukleotide für eine Markierung mit einem Nuk-Makromolekül, bei dem dUTP als Nuk-Komponente auftritt, in folgenden Verhältnissen gemischt  
10 werden:

dATP : dCTP : dGTP : dTTP : dUTP-Nuk-Makromolekül = 1:1:1:0,9:0,1

oder dATP : dCTP : dGTP : dTTP : dUTP-Nuk-Makromolekül = 1:1:1:0,7:0,3

oder dATP : dCTP : dGTP : dTTP : dUTP-Nuk-Makromolekül = 1:1:1:0,95:0,05

die genaue Mischverhältnisse können für einzelne Markierungsreaktionen optimiert  
15 werden.

Auch mehrere Arten der Nuk-Makromoleküle können in einer Reaktion eingesetzt werden. Beispielsweise können Nuk-Makromoleküle unterschiedliche Markierung tragen. In einer Ausführungsform werden die Marker der Nuk-Makromoleküle so

gewählt, dass sie ein FRET-Paar bilden (Faner, R et al. *Hum Immunol* 2004, v.65,

20 826-38, Lazowski, K. W et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000, v.10, 97-103,

Talavera, E. M., *Appl Spectrosc* 2003, v.57, 208-15, Tsourkas, A. et al. *Anal Chem*,

2003, v. 75, 3697-703, Singh, K. K., et al. *Methods Mol Biol* 2004, v.252, 33-48,

Wang, L., *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* , 2004, v.60, 2741-50 ). Nach

dem Einbau solcher Nuk-Makromoleküle in die wachsende Nukleinsäurekette

25 verringert sich die durchschnittliche Distanz zwischen den Fluorophoren, so dass es bei der Anregung des Donors zu FRET an den Akzeptor kommt. Da die Nuk-

Makromoleküle eine deutlich stärkere Markierung tragen als die konventionell modifizierten Nukleotide, kann die Signalintensität eines FRET-Signal deutlich größer

sein. Die genauen Bedingung der Reaktion können im Hinblick auf die Wahl der

30 Fluorophore, ihre Kopplung im Nuk-Makromolekül, die Konzentration der Nuk-

Makromoleküle und Verhältnis zwischen den Nuk-Makromolekülen und nicht

markierten Nukleotiden optimiert werden. Als generelle Regel gilt dabei, dass die

durchschnittliche Distanz zwischen den Fluorophoren eines FRET-Paars sollte unter 10 nm liegen.

35



## **Festphasenverfahren**

In einer weiteren Ausführungsform der Markierungsverfahren sind die zu markierenden Nukleinsäureketten oder deren komplementären Stränge an einer festen Phase fixiert. Viele Verfahren zur Markierung von immobilisierten

- 5 Nukleinsäureketten mit konventionell modifizierten Nukleotiden sind bekannt (Suomalainen A et al. Methods Mol Biol. 2003, Pirrung MC et al. Bioorg Med Chem Lett. 2001 Sep 17;11(18):2437-40). Beispiele für die feste Phase stellen Mikrokügelchen (Spherotech Inc, Streptavidin-polystyrene Particle, 2.17µ). Im Beispiel 34C wird eine Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen an fester Phase beschrieben.
- 10 Ein weiteres Beispiel für die feste Phase stellen planare Oberflächen, an die Nukleinsäuren gebunden sind.

Die Nuk-Makromoleküle eignen sich für Analysenverfahren mit einer Einbaureaktion an den an einer festen Phase gekoppelten Nukleinsäuren, sie können ähnlich zu

- 15 konventionell modifizierten Nukleotiden in vielen Verfahren eingesetzt werden, wie beispielsweise Minisequencing (Suomalainen A et al. Methods Mol Biol. 2003;226:361-6. Liljedahl U et al. Pharmacogenetics. 2003 Jan;13(1):7-17, Olsson C et al. Methods Mol Biol. 2003;212:167-76), Primer-Extension (Pirrung MC et al. Bioorg Med Chem Lett. 2001 Sep 17;11(18):2437-40, Cai H, et al. Genomics. 2000 Jun 1;66(2):135-
- 20 43., Kurg A et al. Genet Test. 2000;4(1):1-7., Pastinen T et al. Genome Res. 1997 Jun;7(6):606-14). US pat. 6287766, US pat. 2003148284, US pat. 2003082613, EP 1256632, WO0194639, WO 2004/076692, Ju et al. US Pat. 6664079. Fest-Phasen-PCR (WO 9626291, WO 9409156, US Pat. 6221635), Sequenzierung durch die Synthese (Ju et al US Pat. 6664079), Single-Molecular-Sequencing (Tcherkassov WO
- 25 02088382, Seeger WO 0018956, Kartalov WO 02072892). In vielen Fällen erfolgt dabei eine Synthese der komplementären Stränge an den fixierten Primer-Matrizen-Komplexen.

Viele Analyse-Verfahren bei denen Nukleinsäureketten fixiert sind, benötigen

- 30 routinemäßig Vervielfältigungsschritte. In solchen Verfahren können Nuk-Makromoleküle einen besonders großen Vorteil bringen, da die Signal-Intensität überdurchschnittlich gesteigert wird. Die Zahl der signalgebenden Marker-Einheiten von Nuk-Makromolekülen kann eine noch während der Synthese festgelegte Größe aufweisen, so dass die Intensität des Signal von den eingebauten Nuk-
- 35 Makromolekülen quantifiziert werden kann.

Bei solchen Verfahren können Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die fluoreszente, radioaktive oder Enzyme als Marker-Einheiten einschließen.

Sehr vorteilhaft bei solchen Verfahren ist die Verwendung von Nuk-Makromolekülen mit Fluoreszenzsignalen, da die Fluoreszenz eine hohe Sensitivität aufweist.

In einer Ausführung solcher Verfahren erfolgt die Detektion der Fluoreszenz-Signale von den Markern der eingebauten Nuk-Makromoleküle. Dabei können auch FRET-Paare zwischen einzelnen Nuk-Makromolekülen verwendet werden. In einer weiteren Ausführung können bei der Markierung an einer festen Phase fixierten Nukleinsäureketten markierte Primer eingesetzt werden, wobei die Primer in einer Ausführungsform einen oder mehrere Nuk-Makromoleküle einschließen und in einer weiteren Ausführungsform eine konventionelle Markierung einschließen.

In diesen beiden Ausführungsformen kann die Markierung am Primer als ein Teil eines FRET-Paars auftreten. Der an Primer gekoppelte Partner eines FRET-Paars kann dabei als Donor als auch als Akzeptor während der Detektion auftreten. Die eingebauten Nuk-Makromoleküle mit einem entsprechenden Partner des FRET-Paars können dabei einen abspaltbaren oder auch einen nicht abspaltbaren Marker tragen.

Durch den Einsatz des FRET zwischen den eingebauten Nuk-Makromolekülen oder der Primer-Markierung und den eingebauten Nuk-Makromolekülen kann eine große Steigerung der Signalspezifität erzielt werden. Die Detektion kann dabei in einer Ausführungsform während des Einbaus in einer anderen Ausführungsform als separater Schritt des Verfahrens erfolgen.

In einer Ausführungsform tragen Nuk-Makromoleküle mit Nuk-Komponente einer Art (beispielsweise dTTP) vorzugsweise eine für sie spezifischen Marker-Komponente, so dass beispielsweise 4 Arten der Nuk-Makromoleküle (entsprechend dem dTTP, dCTP, dATP und dGTP) gleichzeitig eingesetzt und unterschieden werden können. Andere Markierungsschemata sind bekannt s. z.B. Tcherkassov WO 02088382. Je nach Verfahren werden auch nicht markierte, z.B. natürliche Nukleotide in das Reaktionsgemisch zusammen mit den Nuk-Makromolekülen zugegeben.

In einer Ausführungsform der Markierungsverfahrens werden Nuk-Makromoleküle eingesetzt, die den Einbau nur einer einzelnen Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäure-Strang erlauben und der mehrfache Einbau durch Modifikationen an der Nuk-Komponente, und/oder der Linker-Komponente und/oder der Marker-Komponente verhindert wird. Der weitere Einbau kann sowohl reversibel als auch irreversibel verhindert werden. Ein irreversibler Stopp kann beispielsweise durch den Einsatz von Nuk-Makromolekülen erreicht werden, die als Nuk-Komponente ein Dideoxi-Nukleosidtriphosphat einschließen. Ein reversibler Stopp kann in einem weiteren Verfahrensschritt aufgehoben werden, so dass weitere Einbaureaktionen stattfinden

können. Beispiele für eine reversible Blockade der Reaktion sind in Anmeldungen (Metzker et al. Nucleic acid Research 1994, V.22, S. 4259, Canard et al. Gene, 1994, V. 148, 1, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642, Tcherkassov WO 02088382, Ju et al. US Pat. 6664079, Milton et al. WO 2004018497, Milton et al. WO 2004018493, Balasubramanian et al. WO 03048387) beschrieben.

In einer anderen Ausführungsform verhindern die bereits eingebauten Nuk-Makromoleküle den weiteren Einbau von Nukleotiden nicht. Falls ein Gemisch aus modifizierten und nicht modifizierten Nukleotiden eingesetzt wird, können nach dem Einbau von einem Nuk-Makromolekül auch weitere Nuk-Makromoleküle in den wachsenden Strang nacheinander eingebaut werden.

Die feste Phase kann beispielsweise eine plane Oberfläche oder Kügelchen (Beads) oder eine Art von Multigefäßarrays (z.B. Microtiterplatte, Nanotiterplatte) darstellen. Dabei können Nukleinsäuren mit verschiedenen Methoden an die feste Phase gekoppelt werden (McGall et al. US Patent 5412087, Nikiforov et al. US Patent 5610287, Barrett et al. US Patent 5482867, Mirzabekov et al. US Patent 5981734, "Microarray biochip technology" 2000 M.Schena Eaton Publishing, "DNA Microarrays" 1999 M. Schena Oxford University Press, Rasmussen et al. Analytical Biochemistry v.198, S.138, Allemand et al. Biophysical Journal 1997, v.73, S.2064, Trabesinger et al. Analytical Chemistry 1999, v.71, S.279, Osborne et al. Analytical Chemistry 2000, v.72, S.3678, Timofeev et al. Nucleic Acid Research (NAR) 1996, v.24 S.3142, Ghosh et al. NAR 1987 v.15 S.5353, Gingeras et al. NAR 1987 v.15 S.5373, Maskos et al. NAR 1992 v.20 S.1679). Es sind Verfahren zur Vervielfältigung der Nukleinsäureketten ausgehend von einzelnen Molekülen beschrieben. Solche Verfahren können zur Ausbildung ortsspezifisch gebundener Populationen der Nukleinsäureketten mit identischer Sequenz eingesetzt werden, wobei sowohl plane Oberflächen als auch Beads verwendet werden können. Vorzugsweise sind die zu analysierenden Nukleinsäurestränge mit einem Primer versehen, so dass es ein Primer-Matrizen-Komplex ausgebildet ist und daran eine enzymatische Synthese eines komplementären Stranges stattfinden kann ("Molecular Cloning", Maniatis, 3. Ed. 2001).

Primer-Extension:

In einer Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen an einer einzigen Population einheitlicher, an der festen Phase

fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach dem Einbau am verlängerten Primer verbleibt und nicht abgetrennt wird.

Solche Verfahren schließen im wesentlichen folgende Schritte ein:

- 5 1) Bereitstellung einer festen Phase mit fixierten Primer-Matrizen-Komplexen
- 2) Inkubation der bereitgestellten festen Phase mit einer Reaktionslösung, die eine oder mehrere Arten der Polymerasen, eine oder mehrere Arten der Nuk-Makromoleküle enthält, wobei die Nuk-Makromoleküle durch ihre Markierung eindeutig identifiziert werden können.
- 10 3) Entfernung der Reaktionslösung und waschen der festen Phase
- 4) Detektion der Signale von eingebauten Nuk-Makromolekülen und die Zuordnung der Art der eingebauten Nuk-Makromoleküle aufgrund ihrer Signaleigenschaften.

Sequenzierung:

- 15 In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen an einer einzigen Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion von der Nuk-Komponente abgetrennt
- 20 wird.

Solche Verfahren schließen im wesentlichen folgende Schritte ein:

- 1) Bereitstellung einer festen Phase mit fixierten Primer-Matrizen-Komplexen
- 2) Inkubation der bereitgestellten festen Phase mit einer Reaktionslösung, die eine oder mehrere Arten der Polymerasen, eine oder mehrere Arten der Nuk-
- 25 Makromoleküle enthält, wobei die Nuk-Makromoleküle durch ihre Markierung eindeutig identifiziert werden können.
- 3) Entfernung der Reaktionslösung und waschen der festen Phase
- 4) Detektion der Signale von eingebauten Nuk-Makromolekülen und die Zuordnung der Art der eingebauten Nuk-Makromoleküle aufgrund ihrer Signaleigenschaften.
- 30 5) Entfernung der Marker-Komponente von den eingebauten Nuk-Makromolekülen
- 6) Wiederholung der Schritte 2 bis 5

Die Wiederholung kann beispielsweise 1 bis 2, 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 30 mal durchgeführt werden.

- 35 In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt der Einbau von Nuk-Makromolekülen in einer enzymatischen Reaktion parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Populationen adressierbare Positionen an der

festen Phase haben, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach dem Einbau am verlängerten Primer verbleibt und nicht abgetrennt wird.

Die adressierbaren Positionen können beispielsweise die Form von Spots haben, im Falle einer planen Oberfläche. Bei der Verwendung von Kügelchen als feste Phase werden unterschiedliche Populationen von Nukleinsäuren an unterschiedlichen Kügelchen fixiert. Bei der Verwendung von Multigefäßarrays (z.B. Mikrotiter-Platte, oder Nanotiter-Platte) sind einzelne Nukleinsäurepopulationen in einzelnen Gefäßen getrennt fixiert.

10 Solche Verfahren schließen im wesentlichen folgende Schritte ein:

- 1) Bereitstellung einer festen Phase mit fixierten Primer-Matrizen-Komplexen
- 2) Inkubation der bereitgestellten festen Phase mit einer Reaktionslösung, die eine oder mehrere Arten der Polymerasen, eine oder mehrere Arten der Nuk-Makromoleküle enthält, wobei die Nuk-Makromoleküle durch ihre Markierung eindeutig identifiziert werden können.
- 3) Entfernung der Reaktionslösung und waschen der festen Phase
- 4) Detektion der Signale von eingebauten Nuk-Makromolekülen und die Zuordnung der Art der eingebauten Nuk-Makromoleküle aufgrund ihrer Signaleigenschaften.

20 In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt der Einbau von Nuk-Makromolekülen in einer enzymatischen Reaktion parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Populationen adressierbare Positionen an der festen Phase haben. Die einheitlichen Nukleinsäurepopulationen können durch unterschiedliche Verfahren an die Oberfläche fixiert werden (s.o.). Die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls wird bei dieser Ausführungsform während der Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion von der eingebauten Nuk-Komponente abgetrennt. Für solche Verfahren eignen sich Nuk-Makromoleküle mit spaltbaren Verbindungen im Linker. Die adressierbaren Positionen können beispielsweise die Form von Spots haben, im Falle einer planen Oberfläche. Bei der Verwendung von Kügelchen als feste Phase werden unterschiedliche Populationen von Nukleinsäuren an unterschiedlichen Kügelchen fixiert. Bei der Verwendung von Multigefäßarrays sind einzelne Nukleinsäurepopulationen in einzelnen Gefäßen getrennt fixiert.

35

Solche Verfahren schließen im wesentlichen folgende Schritte ein:

- 1) Bereitstellung einer festen Phase mit fixierten Primer-Matrizen-Komplexen

2) Inkubation der bereitgestellten festen Phase mit einer Reaktionslösung, die eine oder mehrere Arten der Polymerasen, eine oder mehrere Arten der Nuk-Makromoleküle enthält, wobei die Nuk-Makromoleküle durch ihre Markierung eindeutig identifiziert werden können.

5 3) Entfernung der Reaktionslösung und waschen der festen Phase

4) Detektion der Signale von eingebauten Nuk-Makromolekülen und die Zuordnung der Art der eingebauten Nuk-Makromoleküle aufgrund ihrer Signaleigenschaften.

5) Entfernung der Marker-Komponente von den eingebauten Nuk-Makromolekülen

6) Wiederholung der Schritte 2 bis 5

10 Die Wiederholung kann beispielsweise 1 bis 2, 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 30, 30 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200 mal durchgeführt werden.

Ein einer Ausführungsform eines solchen Verfahrens werden im Schritt (2) Nuk-Makromoleküle zusammen mit den anderen modifizierten Nukleotiden eingesetzt.

15 Dabei erfolgt die Synthese des komplementären Stranges schrittweise: pro ein Syntheseschritt werden komplementäre Stränge maximal um ein Nukleotid verlängert.

Die Kontrolle der enzymatischen Reaktion erfolgt dabei durch reversible Terminatoren.

Vorzugsweise werden die an 3'-OH-Gruppe modifizierten Terminatoren eingesetzt, die

20 keine weiteren Modifikationen an der Base tragen. Nach der Abspaltung der Modifikation vom eingebauten Nukleotid kann weitere Synthese an diesen Strängen stattfinden.

Die Struktur der in dieser Ausführungsform eingesetzten Nuk-Makromoleküle kann unterschiedlich sein. Vorzugsweise sind es terminierende Nuk-Makromoleküle, d.h. nach ihren Einbau kann kein weiteres Nukleotid durch eine

Polymerase eingebaut werden. Der Linker ist vorzugsweise an die Base der Nuk-

25 Komponente gekoppelt und schließt eine spaltbare Verbindung ein. Das Zusammenmischen der Nuk-Makromoleküle mit terminierenden Eigenschaften und der reversiblen Terminatoren erlaubt an einer Population der Nukleinsäureketten die

Markierung und die reversible Termination zu trennen. Da die Nuk-Makromoleküle in dieser Ausführungsform des Verfahrens terminierend wirken, steht in jedem weiteren

30 Einbauschritt eine geringere Anzahl an Strängen für weitere Sequenzierungsreaktion zur Verfügung. Damit eine Einbaureaktion in weiteren Schritten stattfinden kann, muß ein Teil der Stränge in jedem Schritt reversibel blockiert werden. Der Anteil der mit

Nuk-Makromolekülen modifizierten Nukleinsäureketten kann sehr gering sein, da die Signalstärke der Nuk-Makromoleküle sehr groß sein kann. Das Verhältnis zwischen

35 den Nuk-Makromolekülen und reversiblen Terminatoren in einem Reaktionsschritt kann beispielsweise in folgenden Bereichen liegen: zwischen 100 :1 und 1:10, zwischen 10 :1 und 1:1, 1 :1 und 1:10, zwischen 1:10 und 1:100, zwischen 1:100

und 1:1000 (Konzentration von Nuk-Makromoleküle : Konzentration von reversiblen

Terminatoren). Dieses Verhältnis kann während der gesamten Sequenzierungsreaktion konstant bleiben oder variieren. Da Polymerasen die Nuk-Makromoleküle und die reversiblen Terminatoren unterschiedlich gut akzeptieren können, können mehrere Polymerase-Arten während des Einbauschriffs eingesetzt werden.

5 Die Entfernung der Signale nach der Detektion führt zu einem besseren Signal-Rauschen-Verhältnis bei den nächsten Detektionen und ist typisch für die Verfahren der Sequenzierung durch die Synthese. Die Aufhebung der reversiblen Terminierung kann in einem eigenen Schritt erfolgen oder beispielsweise mit dem Schritt der Entfernung der Markierung zusammenfallen.

10 Der Vorteil des Einsatzes der Nuk-Makromoleküle besteht darin, dass die Markierung eines geringen Anteils der Gesamtpopulation zur Detektion des Einbauereignisses ausreicht. Dies erlaubt mit wesentlich geringeren Mengen des Ausgangsmaterials die Sequenzierungsreaktion durchzuführen. Die Verwendung von reversiblen Terminatoren mit einer Schutzgruppe an der 3'-Position und einer Base ohne Modifikation führt  
15 dazu, dass das nach der Entfernung der blockierenden Gruppe in der Nukleinsäurekette verbleibende Nukleotid keine weiteren Modifikationen trägt und somit als natürliches Substrat von Polymerasen gut akzeptiert wird.

In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens, werden folgende Schritte  
20 durchgeführt:

- a) Bereitstellung mindestens einer Population an einzelsträngigen Nukleinsäureketten
- 25 b) Hybridisierung von sequenzspezifischen Primern an diese Nukleinsäureketten, wobei extensionsfähige NSK-Primer-Komplexe entstehen
- c) Inkubation von mindestens einer Art der Nuk-Makromoleküle nach Aspekten 1 bis 25 zusammen mit einer Art der Polymerase nach Aspekt 31 mit den in Schritten a und b bereitgestellten NSK-Primer-Komplexen unter  
30 Bedingungen, die den Einbau von komplementären Nuk-Makromolekülen zulassen, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt.
- d) Entfernung der nicht eingebauten Nuk-Makromoleküle von den NSK-Primer-Komplexen
- 35 e) Detektion der Signale von in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
- f) Entfernung der Linker-Komponente und der Marker-Komponente von den in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen

g) Waschen der NSK-Primer-Komplexe  
gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (c) bis (g),

In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die Einbaureaktion von NT-Makromolekülen gleichzeitig an einer Population unterschiedlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Nukleinsäuremoleküle in einer zufälligen Anordnung an die feste Phase gebunden sind (Tcherkassov WO 02088382). Bei diesem Verfahren werden Sequenzen von einzelnen Nukleinsäurekettenmolekülen ermittelt. Die an der enzymatischen Reaktion teilnehmende Primer-

Nukleinsäurekomplexe sind in einer Dichte fixiert, die die Detektion der Signale von einzelnen Nuk-Makromolekülen ermöglicht, die an ein einzelnes Nukleinsäure-Molekül gekoppelt sind, wobei die Dichte der fixierten Primer oder Nukleinsäuren wesentlich höher liegen kann. Beispielsweise beträgt die Dichte der an der Einbaureaktion teilnehmenden Primer-Nukleinsäurekomplexe von 1 Komplex auf  $10\mu\text{m}^2$  bis 1 Komplex auf  $100\mu\text{m}^2$ , von 1 Komplex auf  $100\mu\text{m}^2$  bis 1 Komplex auf  $1000\mu\text{m}^2$ , von 1 Komplex auf  $1000\mu\text{m}^2$  bis 1 Komplex auf  $10.000\mu\text{m}^2$ .

Beispiele der Fixierung der Nukleinsäuren an die feste Phase mit einer Auflösung, die Analysen an einzelnen Molekülen erlaubt sind in WO0157248, US Pat. 2003064398, US Pat.2003013101 und WO 02088382 dargestellt. Eine passende

Detektionsapparatur ist in der Anmeldung WO 03031947 beschrieben.

Die Zahl der parallel zu analysierenden einzelnen Nukleinsäuremoleküle liegt beispielsweise zwischen 1000 und 100.000, 10.000 bis 1.000.000, 100.000 bis 10.000.000 Moleküle. Wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker- Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion von der Nuk- Komponente abgetrennt wird..

Dieses Verfahren zur parallelen Sequenzanalyse von Nukleinsäuresequenzen (Nukleinsäureketten, NSKs) schließt folgende Schritte ein, man:

- Fragmente (NSKFs) einzelsträngiger NSKs mit einer Länge von etwa 50 bis 1000 Nukleotiden erzeugt, die überlappende Teilsequenzen einer Gesamtsequenz darstellen können, man



- die NSKFs unter Verwendung eines einheitlichen oder mehrerer unterschiedlichen Primer in Form von NSKF-Primer-Komplexen auf einer Reaktionsoberfläche in einer zufälligen Anordnung bindet, wobei die Dichte der an die Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine optische Detektion der Signale von einzelnen eingebauten Nuk-Makromolekülen zulässt, man

- eine zyklische Aufbaureaktion des komplementären Stranges der NSKFs unter Verwendung einer oder mehrerer Polymerasen durchführt, indem man

a) zu den auf der Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine Lösung zugibt, die eine oder mehrere Polymerasen und ein bis vier Nuk-Makromoleküle enthält, die eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Marker-Komponente haben, wobei die bei gleichzeitiger Verwendung von mindestens zwei Nuk-Makromoleküle jeweils an die Marker-Komponente befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe so gewählt sind, dass sich die verwendeten Nuk-Makromoleküle durch Messung unterschiedlicher Fluoreszenzsignale voneinander unterscheiden lassen, wobei die Nuk-Makromoleküle strukturell so modifiziert sind, dass die Polymerase nach Einbau eines solchen Nuk-Makromoleküls in einen wachsenden komplementären Strang nicht in der Lage ist, ein weiteres Nuk-Makromolekül in denselben Strang einzubauen, wobei die Linker-Komponente mit der Marker-Komponente abspaltbar sind, man

b) die in Stufe a) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen inkubiert, die zur Verlängerung der komplementären Stränge geeignet sind, wobei die komplementären Stränge jeweils um ein Nuk-Makromolekül verlängert werden, man

c) die in Stufe b) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung nicht in einen komplementären Strang eingebauter Nuk-Makromoleküle geeignet sind, man

d) die einzelnen, in komplementäre Stränge eingebauten Nuk-Makromoleküle durch Messen des für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Signals detektiert, wobei man gleichzeitig die relative Position der einzelnen Fluoreszenzsignale auf der Reaktionsoberfläche bestimmt, man

e) zur Erzeugung unmarkierter (NTs oder) NSKFs die Linker-Komponente und die Marker-Komponente von den am komplementären Strang angefügten Nuk-Komponenten abspaltet, man

5

f) die in Stufe e) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung der Marker-Komponente geeignet sind, man

die Stufen a) bis f) gegebenenfalls mehrfach wiederholt,

10

wobei man die relative Position einzelner NSKF-Primer-Komplexe auf der Reaktionsoberfläche und die Sequenz dieser NSKFs durch spezifische Zuordnung der in Stufe d) in aufeinanderfolgenden Zyklen an den jeweiligen Positionen detektierten Fluoreszenzsignale zu den Nuk-Makromolekülen bestimmt.

15

#### **Anwendung von Nukleinsäureketten, die Nuk-Makromoleküle einschließen.**

Nach dem Einbau eines Nuk-Makromolekül an das 3'-Ende der Nukleinsäure behalten die nun ihrerseits modifizierten Nukleinsäureketten überraschenderweise die Fähigkeit zur Kopplung weiterer Nukleotide an die 3'-Hydroxylgruppe durch Polymerasen, s.

20

Beispiel 34C. Dies bedeutet, dass nicht nur die Nuk-Komponente in den Nuk-Makromolekülen sondern auch die mit diesen Nuk-Makromolekülen modifizierten Nukleinsäureketten für die Enzyme zugänglich bleiben können und in unterschiedlichen Bereichen der Biotechnologie eine Anwendung finden. Nicht nur am 3'-Ende mit Nuk-Makromolekülen modifizierte Nukleinsäureketten, sondern Nukleinsäureketten, die am 5'-Ende oder im inneren Bereich des Nukleinsäurepolymers eines oder mehrere Nuk-Makromoleküle als Monomere einschließen, behalten ihre Substrateigenschaften für Polymerasen, Exonukleasen und Ligasen. Beispiele für die Anwendungen von mit Nuk-Makromolekülen modifizierten Oligonucleotiden sind dem Fachmann bekannt, z.B. in den Primer-Extension-Reaktionen, Real Time PCR oder Ligase-Reaktionen.

25

30

#### **Wahl der Enzyme:**

Nukleotide spielen als Monomere eine zentrale Rolle in unterschiedlichen Stoffwechselvorgängen, beispielsweise bei der Speicherung und Übertragung der genetischen Information in der Zelle ("Genes V" B. Lewin, 1994). Auch sind Nukleotide als Energieträger der Zelle bekannt (ATP, UTP), oder Signalvermittler (Messenger, GTP) der intrazellulären Signalvermittlung ("Biochemie und Pathobiochemie", G. Löffler,

35

2003). Aus diesem Grund werden Nukleotide und ihre Analoga als Therapeutika und Diagnostika eingesetzt.

Gekoppelt in Nukleinsäurepolymere (Nukleinsäureketten) stellen die Nukleotid-Monomere die Basis für die Informationsspeicherung in den lebenden Organismen dar.

5

Nuk-Makromoleküle haben das Potenzial, in unterschiedlichen Bereichen der Biotechnologie eine Anwendung zu finden.

Die Möglichkeit einer Kopplung der Nukleotide an ein Makromolekül unter Beibehaltung der Substrateigenschaften der Nukleotide eröffnet viele Wege auch für eine gezielte Adressierung der modifizierten Nukleotiden innerhalb eines Organismus oder einer Zelle, so dass Nuk-Makromoleküle ein neues grundsätzliches Model für Nukleotid-Prodrugs darstellen.

15 Als Enzyme können beispielsweise unterschiedliche Sorten von Polymerasen verwendet werden ("DNA Replication", Kornberg, 2. Ed. 1992), im einzelnen DNA-abhängige DNA-Polymerasen, RNA-abhängige DNA-Polymerasen, DNA-abhängige RNA-Polymerasen und RNA-abhängige RNA-Polymerasen. Dabei können sowohl thermostabile als auch thermolabile Polymerasen verwendet werden, wie  
20 beispielsweise Klenow-Polymerase oder Taq-Polymerase. Andere Beispiele für mögliche Polymerasen findet ein Fachmann in der hier zitierten Literatur. Ein weiteres Beispiel für Enzyme stellen Transferasen, wie Terminale Deoxynucleotidyltransferase ("Molecular Cloning", Maniatis, 3. Ed. 2001), dar. Auch andere Enzyme und Proteine (beispielsweise Kinasen, Membranrezeptoren) die Nukleotide als Substrate),  
25 Energiequelle, Cofaktoren oder als Messenger-Substanzen akzeptieren können verwendet werden.

Enzyme unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, modifizierte Nukleotide als Substrate zu akzeptieren. Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, dass verschiedene  
30 funktionelle Tests eingesetzt werden müssen, um bestimmte Eigenschaften von Nukleotiden zu untersuchen und anzuwenden. Beispiele für unterschiedliche Testabläufe für die Markierung von Nukleinsäuren sind in H. Held et al. Nucleic Acid Research 2002, V. 30, S. 3857, M. Metzger et al. Nucleic Acid Research 1994, V. 22, 4259, M. Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta 1994, V.77, S. 586, B. Canard et al.  
35 PNAS 1995, V. 92, S. 10859, Canard US Pat. 5798210, J. Hovinen et al. J. Chem. Soc. Perkin 1994, 1994, 211 und auch in anderen hier zitierten Patenten und Publikationen angegeben.

Die passenden Kombinationen zwischen Polymerasen und modifizierten Nukleotiden können für den jeweiligen Zweck entsprechend gewählt werden. Beispiele für den Einbau von Nuk-Makromolekülen in die Primer sind in Beispiel 34 angegeben. Die angegebenen Beispiele dienen nicht zur Einschränkung der Verwendungsmöglichkeit von Nuk-Makromolekülen, sondern sollten dem Fachmann den Unterschied in Eigenschaften der Nuk-Makromoleküle zu den konventionellen modifizierten NT darstellen.

Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenprodukte können auch in der konventionellen chemischen Oligonucleotidsynthese verwendet werden, beispielsweise in einer Festphasensynthese (Giegrich, "Neue photolabile Schutzgruppen für die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese", 1997, Beier, "Neue Strategien zum Aufbau von RNA- und DNA-Oligonucleotiden", 1996), dabei trägt die Nuk-Komponente der Nuk-Makromoleküle entsprechende Modifikationen, die eine chemische Kopplung an die Nukleinsäurekette erlaubt, wie beispielsweise in Herrlein, "Synthese von modifizierten Nukleosiden, Nukleotiden und Oligonukleotiden", 1993, Gugler, "Aufbau und Anwendung von Systemen zur vereinfachten chemo-enzymatischen Synthese von Oligonukletid-Hybridisierungssonden", 1993, Schmidt, "Neue Methoden zur Synthese und Isolierung langkettiger Oligonucleotide", 1991, Bühler, "Neue photolabile Schutzgruppen für die Oligonucleotidsynthese", 2000, Bretzger, "Wege zur präparativen Oligonucleotidsynthese" 1991, Stengele, "Automatisierte Oligonucleotidsynthese unter Verwendung [beta]-eliminierbare Schutzgruppen", 1991).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Methode zur schnellen Reinigung der von markierten Nukleotiden direkt vor ihrem Einsatz in die Markierungsreaktion.

Verfahren zur Sequenzierung einzelner Moleküle (z.B. Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382, Kartalov WO02072892) benötigen markierte Nukleotide in einem sehr sauberen Zustand, weil Verunreinigungen einer markierten Nukleotidpräparation mit nicht markierten Nukleotiden einen Sequenzfehler verursachen können. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass die markierten Nukleotide möglichst frei von nicht markierten Nukleotiden sind. Viele Nukleotidmodifikationen, die in solchen Verfahren eingesetzt werden, haben eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Gruppe (Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382)

Während der Lagerung können solche Nukleotide zu einem Teil zerfallen und stellen die Quelle für Nukleotidanaloga ohne Markierung dar, die beim Einbau in die Nukleinsäure zu einem Sequenzfehler führen würden.

- 5 Dieses Problem führt dazu, dass eine Reinigung direkt vor dem Einsatz markierter Nukleotide durchgeführt werden muß. Eine Standardreinigung für modifizierten Nukleotide ist beispielsweise eine HPLC-Reinigung mit Wasser-Methanol-Gradient. Nach einer solchen Reinigung muß die Fraktion mit modifizierten Nukleotiden aufgearbeitet werden, beispielsweise durch Lyophilisation. Eine solche Reinigung stellt  
10 eine aufwendige Prozedur dar.

Nuk-Makromoleküle können erfindungsgemäß direkt vor dem Gebrauch durch eine Ultrafiltration von geringsten Verunreinigungen befreit werden.

- Es werden Filter mit einer Porengröße ausgewählt, die für Nukleotide ohne Marker-  
15 Anteile frei passierbar sind. Die mit einem makromolekularen Marker modifizierten Nukleotide können aber durch den Filter nicht durchgehen. Durch eine solche Reinigung gelingt es in kurzer Zeit Nuk-Makromoleküle in einem sehr sauberen Zustand zu erhalten.

- 20 Es können auch Zwischenprodukte von Nuk-Makromolekülen und Nuk-Makromoleküle mit einem niedermolekularen Marker auf diese Weise gereinigt werden, beispielsweise Nukleotide, die in Beispielen 36 und 38 beschrieben sind.

- Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung von modifizierten Klenow-  
25 Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase zusammen mit den Nuk-Makromolekülen in den enzymatischen Reaktionen, wobei die SH-Gruppe des Cysteins des Klenow-Fragments Exo-minus der DNA-Polymerase chemisch modifiziert ist.

- Diese Modifizierung ist vorzugsweise eine kovalente Modifizierung. Beispiele für eine solche Modifizierung stellt eine Alkylierung an der SH-Gruppe dar, z.B. mit alpha-  
30 Halogen-Acetyl-Derivaten, wie beispielsweise Iodacetamid und seinen Derivaten, Iodacetat und seinen Derivaten, oder mit N-Maleimid-Derivaten, weitere selektive SH-Gruppen Reagenten sind in „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993 CRC Press Inc. beschrieben. Diese Modifizierung kann auch durch einen  
35 Fluoreszenzfarbstoff erfolgen. Aktivierte Fluoreszenzfarbstoffe, die selektiv mit SH-Gruppen reagieren, sind kommerziell erhältlich, z.B. von Molecular Probes Inc.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt eine selektive Modifikation des Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase an SH-Gruppe des

Cysteins. Beispiel für die Herstellung eines solchen Klenow-Fragments Exo-minus der DNA-Polymerase ist unter Beispiel 43 angegeben.

In einer anderen Ausführungsform können auch andere Modifikationen an der DNA-Polymerase vorgenommen werden, wie beispielsweise Kopplungen an Amino-Gruppen

5 der DNA-Polymerase.

Das an dem Cysten modifizierte Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase kann in einer Ausführungsform an stelle eines nicht modifizierten Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase zusammen mit Nuk-Makromolekülen in der enzymatischen Einbau-Reaktion eingesetzt werden.

## **Allgemeine Hinweise für die Synthesen von Nuk-Makromolekülen**

Die erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle können auf unterschiedliche Art und Weise synthetisiert werden. Die Reihenfolge der Kopplungsschritte kann variieren. Beispielsweise kann zunächst eine Linker-Komponente an die Nuk-Komponente gekoppelt werden, anschließend wird die Marker-Komponente gekoppelt.

Andererseits können ein oder mehrere Linker an die Marker-Komponente gekoppelt werden und anschließend der / die Nuk-Komponenten.

Die Kopplung zwischen einzelnen Komponenten der Nuk-Makromoleküle kann kovalent oder affin erfolgen. Wobei sowohl chemische als auch enzymatische Kopplung zur Verknüpfung einzelner Komponenten eingesetzt werden kann. Kopplungen an Amino- und Thiolgruppen dienen als Beispiele für kovalente Kopplungen (D. Jameson et al. Methods in Enzymology 1997, V. 278, S. 363-, "The chemistry of the amino group" S. Patai, 1968, "The chemistry of the thiol group" S. Patai, 1974). Biotin-Streptavidin-Bindung oder Hybridisierung zwischen komplementären Nukleinsäuresträngen oder Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen stellen Beispiele für affine Kopplungen dar.

Die makromolekularen Marker bieten oft eine Vielfalt an Kopplungsmöglichkeiten. Ein makromolekularer Marker kann mehrere Kopplungsstellen für den Linker haben, beispielsweise mehrere Bindungsstellen für Biotin, wie es bei Streptavidin der Fall ist. Ein makromolekularer Marker kann auch mehrere Amino- bzw. Thiol-Gruppen aufweisen. Die Kern-Komponente des Markers kann mit unterschiedlicher Zahl von signalgebenden oder signalvermittelnden Einheiten modifiziert werden. Die genauen Verhältnisse zwischen Marker-Einheiten können variieren. Beispiele für die Modifikation von Polymeren mit Farbstoffen sind bekannt (Huff et al. US Pat. 5661040, D. Brigati US Pat. 4687732). Falls Nukleinsäuren als makromolekulare Marker eingesetzt werden, so können diese unterschiedliche Abschnitte zur Kopplung anderer Makromoleküle besitzen. An einen makromolekularen Marker können andere Makromoleküle gebunden werden, z.B. Enzyme.

Ein Nuk-Makromolekül kann makromolekulare Marker mit unterschiedlichen Detektionseigenschaften tragen, beispielsweise kann ein Nuk-Makromolekül sowohl mehrere Farbstoffmoleküle als auch Stellen zur affinen Bindung (z.B. durch Hybridisierung) weiterer Makromoleküle tragen.

Die Kopplung zwischen der Nuk-Komponenten und der Linker-Komponenten erfolgt vorzugsweise kovalent. Viele Beispiele für eine kovalente Kopplung an Nukleotide oder deren Analoga sind bekannt (Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, v. 278, S. 363-, Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30 3857-, Short US Pat. 6579704,

Odedra WO 0192284). Dabei kann die Kopplung beispielsweise an Phosphat, Amino-, Hydroxy- oder Mercaptogruppen erfolgen.

Oft kann die Linker-Komponente in mehreren Schritten aufgebaut werden.

Beispielsweise wird im ersten Schritt ein kurzer Linker mit einer reaktiven Gruppe an

5 das Nukleotid oder Nucleosid angekoppelt, z.B. Propargylamin-Linker an Pyrimidine

Hobbs et al. US Patent 5.047.519 oder andere Linker z.B. Klevan US Pat. 4,828,979,

Seela US pat. 6211158, US pat. 4804748, EP 0286028, Hanna M. Method in

Enzymology 1996 v.274, S.403, Zhu et al. NAR 1994 v.22 S.3418, Jameson et al.

Method in Enzymology, 1997, v. 278, S. 363-, Held et al. Nucleic acid research, 2002,

10 v. 30 3857-, Held et al. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids, 2003, v. 22, S. 391,

Short US Pat. 6579704, Odedra WO 0192284, Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta,

1994, V. 77, S. 586, Canard US. Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475,

Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642, Faulstich et al. DE 4418691,

Phosphoroamidite (Glen Research Laboratories, <http://www.glenres.com/>, Trilink

15 Biotechnologies, S. Agrawal "Protocols for oligonucleotide conjugation", Humana Press

1994, M.Gait "Oligonucleotide synthesis: a practical approach" IRL Press, 1990),

Dissertation "Synthese basenmodifizierter Nukleosidtriphosphate und ihre

enzymatische Polymerisation zu funktionalisierter DNA", Oliver Thum, Bonn 2002.

Einige Verbindungen kann man käuflich erwerben, z.B. bei Trilink Biotechnologies,

20 Eurogentec, Jena Bioscience.

Diese kurzen Linker dienen als Kopplungseinheiten L oder deren Teile, und sind ein Bestandteil der Linker-Komponente im fertigen Nuk-Makromolekül.

Im zweiten Schritt kann die Kopplung des Nukleotides oder Nucleosides mit einem kurzen Linker an das Linker-Polymer erfolgen. Polymere mit reaktiven funktionellen

25 Gruppen können käuflich erworben werden (Fluka).

Nach der Kopplung des Nukleotids an das Polymer kann nun die Marker-Komponente als letzter Schritt gekoppelt werden.

Oft ist es vorteilhaft an ein Nukleosid einen kurzen Linker zu koppeln, dann, falls

30 erforderlich, dieses modifizierte Nucleosid in ein Nucleosid-Triphosphat umzuwandeln

(Synthesen von Triphosphaten können beispielsweise in folgenden Literaturstellen

gefunden werden: Held et al. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids, 2003, v. 22, S. 391, Faulstich et al. DE 4418691, T. Kovacs, L. Ötvös, Tetrahedron Letters, Vol 29,

4525-4588 (1988) oder Dissertation "Synthese basenmodifizierter

35 Nukleosidtriphosphate und ihre enzymatische Polymerisation zu funktionalisierter DNA", Oliver Thum, Bonn 2002).

Weitere Modifikationen können am Nukleosid-Triphosphat-Analog durchgeführt werden.



Vorstufen für modifizierte Nukleoside können sind beispielsweise bei Trilink Biotechnologies (San Diego, CA, USA) oder bei Chembiotech (Münster, Deutschland) kommerziell erhältlich.

5

Die Kopplung zwischen der Linker-Komponente und der Marker-Komponente kann beispielsweise zwischen reaktiven Gruppen an der Linker-Komponente und der Marker-Komponente erfolgen. Reagenzien für solche Kopplungen sind in "Chemistry of protein conjugation and cross-linking", S. Wang, 1993, ISBN 0-8493-5886-8, ausführlich dargestellt. Die Verfahren zur Handhabung und zur Kopplung von mehreren Makromolekülen sind für unterschiedliche Typen von Makromolekülen auch in oben genannten Patenten dargestellt. Weitere Beispiele für Kopplungen an die und zwischen den Makromolekülen sind für Proteine in "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2; "Reactive dyes in protein and enzyme technology", D. Clonis, 1987, ISBN 0-333-34500-2; "Biophysical labeling methods in molecular biology" G. Likhtenshtein, 1993, 1993, ISBN 0-521-43132-8; "Techniques in protein modification" R. Lundblad, 1995, ISBN 0-8493-2606-0; "Chemical reagents for protein modification" R. Lundblad, 1991, ISBN 0-8493-5097-2; für Nukleinsäuren in "Molecular-Cloning", J. Sambrook, band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5, für andere Polymerarten "Makromoleküle, Chemische Struktur und Synthesen", Band 1, 4, H. Elias, 1999, ISBN 3-527-29872-X beschrieben.

Da die Marker-Komponente meistens viele Kopplungsstellen aufweist, können weitere Modifikationen an kompletten Nuk-Makromolekülen vorgenommen werden. Beispielsweise können überschüssige Amino-Gruppen abgeblockt werden oder durch weiterführende Modifikationen verändert werden.

Je nach Einsatzgebiet und Reaktionsbedingungen, unter denen Nuk-Makromoleküle verwendet werden, können unterschiedliche chemische Bindungsarten zwischen einzelnen Teilen der Makromoleküle von Vorteil sein. So eignen sich beispielsweise bei Verfahren mit Schritten mit höheren Temperaturen, wie z.B. bei Hybridisierung oder PCR, Nuk-Makromoleküle, die kovalente, thermostabile Bindungen zwischen einzelnen Teilen haben.

Nachfolgend sollen beispielhaft einige Möglichkeiten zur Synthese von

Nuk-Makromolekülen dargestellt werden. Diese dienen nicht zur Einschränkung der möglichen Synthesewege und nicht zur Einschränkung der möglichen Nuk-Makromolekülstrukturen.

In folgenden Beispielen werden Nuk-Makromoleküle mit Polyethylenglycol (PEG) als

5 Linker-Komponente angegeben. Beispiele für die Kopplungen von PEG an andere Moleküle sind in "Poly(ethylene glycol) : chemistry and biological applications", 1997 beschrieben. Im einzelnen können sehr unterschiedliche reaktive Gruppen zur Kopplung eingesetzt werden: N-succinimidyl carbonate ( US Pat.. 5,281,698, US Pat. 5,468,478), Amine (Buckmann et al. Makromol. Chem. V.182, S.1379 (1981),  
10 Zalipsky et al. Eur. Polym. J. V.19, S. 1177 (1983)), succinimidyl propionate und succinimidyl butanoate (Olson et al. in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; U.S. Pat. No. 5,672,662), Succinimidyl succinate (Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys. v. 7, S.175 (1984), Joppich et al., Makromol. Chem. 1v. 80, S.1381 (1979),  
15 Benzotriazole carbonate (U.S. Pat. No. 5,650,234), Glycidylether (Pitha et al. Eur. J. Biochem. v. 94, S.11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. v.13, S. 354 (1991), Oxycarbonylimidazole (Beauchamp, et al., Anal. Biochem. v.131, S. 25 (1983), Tondelli et al. J. Controlled Release v.1, S.251 (1985)), p-nitrophenyl carbonate (Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., v.11, S.141 (1985); and Sartore  
20 et al., Appl. Biochem. Biotech., v.27, S.45 (1991)), Aldehyde (Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. v.22, S. 341 (1984), US. Pat. 5824784, US. Pat. 5252714), Maleimide (Goodson et al. Bio/Technology v.8, S. 343 (1990), Romani et al. in Chemistry of Peptides and Proteins v.2, S.29 (1984)), and Kogan, Synthetic Comm. v.22, S.2417 (1992)), Orthopyridyl-disulfide (Woghiren, et al. Bioconj. Chem. v. 4, S. 314 (1993)),  
25 Acrylol (Sawhney et al., Macromolecules, v. 26, S.581 (1993)), Vinylsulfone (U.S. Pat. No. 5,900,461). Weitere Beispiele für Kopplungen von PEG an andere Moleküle sind in Roberts et al. Adv. Drug Deliv. Reviews v. 54, S. 459 (2002), US Pat. 2003124086, US Pat. 2003143185, WO 03037385, US Pat. 6541543, US Pat. 2003158333, WO 0126692 zu finden.

30

Andere ähnliche Polymere können in ähnlicher Art gekoppelt werden. Beispiele für solche Polymere stellen andere Poly(Alkylenglykole), Copolymere aus Ethylenglykol und Propyleneglykol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(saccharide),  
35 Poly(x-Hydroxy-Säuren), Poly(Acrylsäure), Poly(Vinylalkohol).

Die Aufreinigung der Nuk-Komponenten der Nuk-Makromoleküle erfolgt mit konventionellen Mitteln der Nukleotidchemie: beispielsweise mit Kieselgel-

Chromatographie in einem Wasser-Ethanol-Gemisch, Ionenaustausch-Chromatographie in einem Salz-Gradienten und Reverse-Phase-Chromatographie in einem Wasser-Methanol-Gradienten. Für die Nukleotid-Aufreinigung optimierte Chromatographie-Säulen werden z.B. von der Firma Sigma-Aldrich angeboten.

5 Die Aufreinigung von makromolekularen Linker-Komponenten und Marker-Komponenten kann durch Ultrafiltration, Gel-Elektrophorese, Gelfiltration und Dialyse erfolgen, siehe "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2.

10 Die Masse der Nuk-Makromoleküle unterscheidet sich wesentlich von der Masse der Nukleotide. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft, bei den Endreinigungsschritten die Ultrafiltration einzusetzen. Da für die Nuk-Makromoleküle nur eine durchschnittliche Masse berechnet wird, eignet sich Ultrafiltration auch als analytische Methode zur Trennung von Syntheseprodukten.

15 Zur Charakterisierung der Nuk-Makromoleküle können unterschiedliche Methoden der makromolekularen Chemie angewendet werden, z.B. UV-Vis-Spektroskopie, Fluoreszenzmessung, Massenspektroskopie, Fraktionierung, Größenausschlußchromatographie, Ultrazentrifugation und elektrophoretische

20 Techniken, wie IEF, denaturierende und nicht denaturierende Gel-Elektrophorese ("Makromoleküle, Chemische Struktur und Synthesen", Band 1, 4, H. Elias, 1999, ISBN 3-527-29872-X, "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2).

Die Messung von freien SH-Gruppen in einer Substanz erfolgte mit Ellmans Reagenz  
25 (5,5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoesäure), Riddles et al. Method in Enzym. 1983, V.91, S. 49.

### **Modifizierte Nukleinsäureketten**

In einer Ausführung der Erfindung schließen Nukleinsäureketten Nuk-Komponenten  
30 der Nuk-Makromoleküle als Einheiten der Kette ein.

### **Synthese modifizierter Nukleinsäureketten**

Als Monomer einer Polymer-Kette können Nuk-Makromoleküle in unterschiedlicher Art und Weise in die Kette eingebaut bzw. integriert werden. Generell kann man zwischen  
35 den chemischen und enzymatischen Schritten unterscheiden. Im weiteren werden einige Beispiele der Synthese-Strategien vorgestellt.

### **Chemischer Einbau:**

Beim chemischen Einbau kann ein komplettes Nuk-Makromolekül (d.h. Nuk-Linker-Marker) oder auch seine Bestandteile, z.B. nur Nuk-Komponente, oder Nuk-Linker-Komponente, in die Reaktion eingesetzt werden. Beispielsweise wird zunächst die Nuk-Komponente in die Nukleinsäurekette nach Regeln der Oligonukleotid-Synthese (MWG-Biotech, TriLink Biotechnologies, Glen Research Laboratories, , S. Agrawal "Protocols for oligonucleotide conjugation", Humana Press 1994, M.Gait "Oligonucleotide synthesis: a practical approach" IRL Press, 1990) eingebaut, wobei ein Monomer der Kette eine zur Modifikation geeignete, geschützte reaktive Gruppe, beispielsweise eine geschützte Amino- oder Merkapto-Gruppe trägt. Nach der Entfernung der Schutzgruppe kann die Linker-Komponente und die Marker-Komponente an das Oligonukleotid gekoppelt werden.

Die Reinigung kann beispielsweise durch die Ultrafiltration oder durch Elektrophorese erfolgen.

### **Enzymatischer Einbau:**

Ähnlich zum chemischen Einbau kann auch beim enzymatischen Einbau ein komplettes Nuk-Makromolekül (d.h. Nuk-Linker-Marker) oder auch seine Bestandteile, z.B. nur Nuk-Komponente, oder Nuk-Linker-Komponente, in die Reaktion eingesetzt werden. Beispielsweise werden Nuk-Komponenten, die eine zur Kopplung einer Linker-Komponente geeignete reaktive Gruppe tragen, als Triphosphate in einer matrizen-abhängigen polymerase-gesteuerten Reaktion in die Nukleinsäurekette eingebaut. Anschließend kann eine Linker- und Marker-Kopplung erfolgen.

In einer anderen Ausführungsform kann ein komplettes Nuk-Makromolekül in die Nukleinsäurekette eingebaut werden (s. Beispiel 34).

Modifizierte Nukleinsäureketten schließen Ribonucleinsäuren und auch Desoxy-Ribonukleinsäuren ein.

Der Anteil der Nuk-Makromoleküle und der nicht modifizierten Monomeren der Nukleinsäurekette liegt vorzugsweise im Verhältnis zwischen 1:5 und 1:20, 1:20 und 1:100, 1:50 und 1:1000, 1:500 und 1:10000. Auch mehrere Nuk-Makromoleküle können pro eine Nukleinsäurekette eingebaut sein. In einer Ausführungsform schließt eine Nukleinsäurekette nur ein Nuk-Makromolekül ein, in einer weiteren Ausführungsform liegt die Zahl der Nuk-Makromoleküle pro eine Nukleinsäurekette in folgenden Bereichen: 2 bis 20, 5 bis 50, 10 bis 100.

In einer Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül an das 5'-Ende der Nukleinsäurekette integriert.

In einer Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül an das 3'-Ende der Nukleinsäurekette integriert.

- 5 In einer Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül im Inneren der Nukleinsäurekette integriert, wobei der Abstand vom am nächsten liegenden Kettenende in folgenden Bereichen liegt (Zahl der Monomeren der Kette bis zum nächsten Kettenende): 1 bis 2, 2 bis 4, 4 bis 8, 8 bis 15, 15 bis 30, 30 bis 100, 100 bis 500.

### 3. Synthesen von modifizierten Nukleotiden

#### Trennungsmethoden:

Dünnschichtchromatographie, DC:

- 5 Analytisch: „DC-Alufolien 20 x 20 cm Kieselgel 60 F 254“ (VWR), beschichtet mit Fluoreszenzindikator. Visualisierung erfolgt mittels UV-Licht. Laufmittel Ethanol-Wasser-Gemisch (70:30) (Laufmittel, LM 1) oder Ethanol-Wasser-Gemisch (90:10) (LM 2).

Präparativ: Kieselgel-Glasplatten mit Sammelschicht (VWR). LM 1 oder LM 2.

10

Umkehrphasen-Chromatographie (RP-Chromatographie), RP-18:

C-18 Material (Fluka), Säulenvolumen 10ml, Wasser-Methanol-Gradient. Fraktionen je 1ml wurden gesammelt und mit UV-Vis-Spektrometer analysiert. Fraktionen mit ähnlichen Spektren wurden vereinigt und lyophilisiert.

- 15 HPLC-Säulen mit ähnlichem Material können verwendet werden (Sigma).

Ionenaustausch-Chromatographie

DEAE-Zellulose (VWR), Gradient  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  20mmol/l - 1mol/l, Fraktionen wurden unter UV/Vis -Kontrolle gesammelt und auf Grundlage gleicher Spektren vereinigt.

20

Die Affinitätsisolierung von Nuk-Makromolekülen kann beispielsweise eingesetzt werden, wenn Nuk-Makromoleküle Oligonukleotide Bestandteil der Marker-Komponente sind. Durch die Hybridisierung an eine komplementäre, auf einer festen Phase fixierte Nukleinsäure können sie selektiv isoliert werden.

25

Die Bestimmung der Ausbeuten für farbstoffmarkierte Produkte erfolgte an UV-Vis-Spektrometer.

30

Die Vollständigkeit der Kopplung an Streptavidin wurde durch eine Kontrolltitration mit einem Biotin-Farbstoff (Biotin-4-Fluoreszein, Sigma) 100  $\mu\text{mol/l}$  in 50 mmol/l Borat, pH 8, 5 min bei RT durchgeführt. Bei einer kompletten Besetzung von Biotin-Bindungsstellen an Streptavidin während der Synthese erfolgt keine Markierung von Streptavidin. Bei einer nicht ausreichenden Reaktion erfolgt eine Bindung an SA. Analyse mit UV-Vis.

35

## Material:

Diamono PEG 10.000 (Diamino-Polyethylenglycol 10.000, Sigma), dUTP-AA (dUTP-Allylamine, Jena-Bioscience), TTP (Thymidin-Triphosphat, kann auch als dTTP gekennzeichnet werden, Sigma), 3'-Amino-TTP (3'-Amino-3'-deoxy-Thymidin-Triphosphat, Trilink Biotechnologies), PDTP (3-(2-Pyridinyl-dithio)-propionsäure, Fluka), 7-(3-Phthalimido-1-propynyl)-2'-desoxy-7-deazaguanosin und 7-(3-Phthalimido-1-propynyl)-2'-desoxy-7-deazaadenosin (Chembiotech), PDTP-NHS (3-(2-Pyridinyl-dithio)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma), Cy3-NHS (Farbstoff, Amersham Bioscience), Cy3-NHS (Cy3-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Amersham Bioscience), MEA (Mercaptoethylamine, Sigma), DTT (1,4-Dithio-DL-threit, Sigma), CA (Cystamine, Sigma), TCEP - (Tris-(2-carboxyethyl)phosphine, Sigma), DTBP (3,3'-Dithio-Bis-Propionsäure, Fluka), Biotin-NHS (Biotin-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma). J-Ac (Iodoacetat, Sigma), Iodacetamid (Sigma), TEAE (Tris-(2-Aminoethyl)amine, Sigma), Maleimido-ES-NHS (Maleimido-Essigsäure-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma), EDA (Ethylendiamin, Sigma), CDI (1,1'-Carbonyldiimidazol, Sigma), PAS 100 kDa (Polyacrylsäure, 100 kDa, Aldrich), NHS-PEG-Maleimid, 3.400 Da, Biotin-PEG-NHS, 5.000 Da, Fmoc-PEG-NHS, 3.400 Da, mPEG-SPA 5.000 Da, mPEG-SPA 20.000 Da (Nektar), Diamin-PEG, 6.000 Da (Fluka), 3'-Biotin-dT31 ein Oligonucleotid mit einer Sequenz aus 31 Thymidinmonophosphaten, mit einem Biotin-Molekül am 3'-Ende (MWG-Biotech), 3'-SH-Oligo-dT30 ein Oligonucleotid mit einer Sequenz aus 30 Thymidinmonophosphaten, mit einer Merkaptogruppe am 3'-Ende (MWG-Biotech), 3'-Amino-Oligo-dT31-5'-Cy3 ein Oligonucleotid mit einer Sequenz aus 31 Thymidinmonophosphaten, mit einer über einen Linker aus 6 Atomen am 3'-Ende gekoppelten Amino-Gruppe und einem Cy3-Farbstoff, gekoppelt am 5'-Ende (MWG-Biotech), SA (Streptavidin, Roche), SA-Cy2 (mit Cy2-Farbstoff modifiziertes Streptavidin, Amersham Bioscience). QDot (Qdot 605 Streptavidin Conjugat, Quantum Dot). Poly-Lysin 1000 - 2000 (Poly-L-lysin-hydrobromid 1000 -2000 Da, Fluka), Poly-Lysin 10.000 - 20.000 (Poly-L-lysin-hydrobromid 10.000 -20.000 Da, Fluka).

## Lieferanten und Firmenverzeichnis:

Aldrich	- s. Sigma
Amersham	- Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Chembiotech	- Chembiotech, Münster, Deutschland
Fluka	- s. Sigma
Jena-Bioscience	- Jena-Bioscience, Jena, Deutschland
Molecular Probes	- Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande
MWG	- MWG-Biotech, Ebersberg bei München, Deutschland,

Nektar	- Nektar Molecular engineering, früher <i>Shearwater Corporation</i> , <i>Huntsville, AL, USA</i>
Quantum Dot	- Quantum Dot Hayward, CA, USA
Roche	- Roche, Mannheim, Deutschland
5 Sigma	- Sigma-Aldrich-Fluka, Taufkirchen, Deutschland,
Trilink	- Trilink Biotechnologies Inc. San Diego, CA, USA,

Lösungsmittel wurden, wenn nötig, absolutiert verwendet (Fluka) oder nach Standardverfahren getrocknet. Bei Lösungsmittelgemischen beziehen sich die  
10 angegebenen Mischungsverhältnisse auf die eingesetzten Volumina (v/v).

### Synthese einzelner Komponenten:

#### Beispiel 1:

15 dUTP-AA-PDTP, Fig 10A.

20 mg dUTP-AA wurden in 1ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 8.5 eingestellt. Zur dUTP-AA - Lösung wurde PDTP-NHS 60mg in 0.5 ml Methanol, tropfenweise unter Rühren zugegeben. Reaktion wurde 2 h bei 40°C durchgeführt. DC-Kontrolle: dUTP-AA-PDTP ( in LM 1 Rf 0.45).

20 Die Trennung von überschüssigem PDTP-NHS und PDTP erfolgte auf präparativen Kieselgel-Platten, LM 2. Das Produkt, dUTP-AA-PDTP, und dUTP-AA bleiben auf der Startlinie. Die Nukleotide wurden von der Platte mit Wasser eluiert und eingengt. Dieses dUTP-Analog trägt nun eine Disulfid-Bindung, die in einer  
Thiolaustauschreaktion mit anderen Thiolen reagieren kann und eine unter milden  
25 Bedingungen spaltbare Verbindung darstellt.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 7-Deaza-Aminopropargyl-Desoxy-Guanosin-Triphosphat und 7-Deaza-Aminopropargyl Desoxy-  
30 Adenosin-triphosphate, 5-Amino-Propargyl-Desoxy-Uridin-Triphosphate, 5-Amino-Allyl-Desoxy-Uridin-Triphosphate, 5-Amino-Propargyl-Desoxy-Cytidin-Triphosphate können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2`-Deoxyribonukleotide als auch 2`,3`-Deoxyribonukletide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

35

#### Beispiel 2:

dCTP-PA-PDTP, Fig. 10B

Die Synthese wurde wie für dUTP-AA-PDTP, Beispiel 1, beschrieben durchgeführt.



### **Beispiel 3:**

dUTP-AA-Propionat-SH, Fig. 15

Zu 200 µl 40 mmol/l Lösung von dUTP-AA-PDTP wurde 1 ml TCEP-Lösung 250 mmol/l, pH 8, eingestellt mit NaOH, zugegeben und 10 min bei RT gerührt.

Die Trennung der Nukleotide von anderen Reagenzien erfolgte auf präparativen Kieselgel-Platten, LM 2. Produkt, dUTP-AA-Propionat-SH, bleibt auf der Startlinie. Die Nukleotide wurden von der Platte mit Wasser eluiert und eingengt.

Dieses dUTP-Analog trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

### **Beispiel 4:**

Biotin-PEG-Ethyl-SH, Fig.16

Zu 200 µl wässriger CA-Lösung (100 mmol/l), pH 8.5, eingestellt mit NaOH, wurden 10 mg Biotin-PEG-NHS zugegeben und bei 40°C 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde 200 µl TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration auf 3.000 MWCO (Molecular weight cut off) von anderen Reagenzien getrennt. Ausbeute 35%.

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

### **Beispiel 5:**

Bis-Dithio-(Ethyl-PEG-Biotin),

Zu 1 ml wässriger CA-Lösung (2 mmol/l), pH 8.5 mit NaOH eingestellt, wurden 100 mg Biotin-PEG-NHS zugegeben und bei RT 18 Stunden gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration auf 10.000 MWCO von anderen Reagenzien getrennt und lyophilisiert.

Ausbeute 13%.

Das Produkt besitzt eine Disulfid-Verbindung, die an Thiolaustauschreaktionen teilnehmen kann.

### **Beispiel 6:**

MEA-Cy3, Fig. 17

Zu 1 ml wässriger CA-Lösung, 200 mmol/l, pH 8.5 eingestellt mit NaOH, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 10 mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde 1 ml TCEP-Lösung (0.5

mol/l), pH 8.0 eingestellt mit NaOH, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde auf RP-18 getrennt (Wasser-Methanol-Gradient) und auf 0.5ml eingengt, Ausbeute 93%, UV-Vis.

- 5 Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

#### **Beispiel 7:**

Cy3-TEAE, Fig. 18

- 10 Zu 1ml wässriger TEAE-Lösung, 300 mmol/l, pH 8.5 mit NaOH eingestellt, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 5mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde auf RP-18 getrennt und auf 0.5ml eingengt, Ausbeute 82%, UV-Vis.
- Das Produkt hat zwei Aminogruppen, die leicht mit anderen Reagentien modifiziert
- 15 werden können und neue Funktionalitäten an den Farbstoff koppeln können.

#### **Beispiel 8:**

Cy3-TEAE-Propionat-SH, Fig. 19

- Zu 300µl wässriger Cy3-TEAE, 2mmol/l, pH 7.5, wurden langsam 30µl einer frisch
- 20 bereiteten methanolischen Lösung von PDTP-NHS, 30mmol/l, zugegeben. Der Ablauf der Reaktion wurde durch DC, LM 1, kontrolliert. Als Reaktionsprodukte erscheinen auf DC Substanzen (LM 1) mit Rf. 0.55 (Cy3-TEAE-PDTP) und 0.95 (Cy3-TEAE-(PDTP)<sub>2</sub>).
- Nach Ablauf von 1 h wurde die Reaktion gestoppt und die Produkte auf DC mit LM 1
- 25 getrennt. Die Substanz mit Rf. 0.55 wurde isoliert, eingengt und in 200µl Wasser aufgelöst. Zu dieser Lösung wurde 0.1ml TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt, Cy3-TEAE-Propionat-SH, wurde auf RP-18 getrennt (Wasser-Methanol-Gradient) und auf 0.5ml eingengt, Ausbeute 26%, UV-Vis.
- Das Produkt trägt einerseits eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden
- 30 kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung, andererseits eine Amino-Gruppe, die mit anderen Reagentien reagieren kann.

#### **Beispiel 9:**

TEAE-(Cy3)<sub>2</sub>, Fig. 20

- 35 Zu 1ml wässriger TEAE-Lösung, 2 mmol/l, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 4mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Das Produkt (Rf. 0.45) wurde auf präparat. Kieselgel DC mit LM 1 von anderen Reaktionsprodukten getrennt, mit 50mM Borat-Puffer, pH 9, eluiert, danach

auf RP-18 gesammelt und anschließend mit 50% Et-OH eluiert und auf 0.5ml eingengt, Ausbeute 22%, UV-Vis.

**Beispiel 10, Fig. 21**

5 Poly-Lysin-(Cy3)<sub>n</sub>, n = 10-15, Poly-Lysin 10.000-20.000

Zu 1ml wässriger Poly-Lysin-Lösung, 1 mmol/l, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 18mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 40 min bei RT gerührt. Die Trennung von modifiziertem Poly-lysin von Farbstoffresten erfolgte durch Ultrafiltration, 3000 MWCO. Bestimmung der durchschnittlichen Zahl Cy3-Moleküle erfolgte über UV-Vis-Spektrometer.

Poly-Lysin stellt ein Beispiel für ein Kern-Komponente dar, an die mehrere Marker-Einheiten, beispielsweise Farbstoffe gekoppelt werden können. In diesem Experiment wurde die Verteilung von Cy3-Molekülen in Poly-Lysin-Population rechnerisch ermittelt, aus den bekannten Größenunterschieden der Poly-Lysin-Moleküle und der mittleren ermittelten Zahl von Cy3-Moleküle.

**Beispiel 11,**

TEAE-(Cy3)<sub>2</sub>-PDTP und TEAE-(Cy3)<sub>2</sub>-Propionat-SH, Fig 22:

20 Zu 200µl TEAE-(Cy3)<sub>2</sub>, 1mmol/l wurden 10mg, PDTP-NHS zugegeben und 1 Stunde bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde durch DC, LM 1, kontrolliert. Nach 1 h wurde eine fast quantitative Umsetzung von TEAE-(Cy3)<sub>2</sub> (Rf. 0.45) zu TEAE-(Cy3)<sub>2</sub>-PDTP, (Rf. 0.85) festgestellt. Der Ansatz wurde in zwei gleiche Teile geteilt.

Das Produkt, TEAE-(Cy3)<sub>2</sub>-PDTP, aus dem ersten Teil wurde auf RP-18 getrennt und lyophilisiert. Ausbeute 82%, UV-Vis.

Das Produkt trägt eine Disulfidbindung, die leicht an einer Thiolaustauschreaktion teilnehmen kann und somit an andere Verbindungen gekoppelt werden kann.

Zum zweiten Teil wurde 0.1ml TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zum Ansatz zugegeben und noch 10 min bei RT gerührt. Das Produkt, TEAE-(Cy3)<sub>2</sub>-Propionat-SH, wurde auf RP-18 getrennt, Ausbeute 68%, UV-Vis.

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

**Beispiel 12, Fig 23**

(HS-Propionat)<sub>m</sub>-Poly-Lysin-(Cy3)<sub>n</sub>, (n = 10-15, m 3-9, Poly-Lysin 10.000-20.000)

Zu 200µl Poly-Lysin-(Cy3)<sub>n</sub>, 1mmol/l wurden 10mg, PDTP-NHS zugegeben und 1 Stunde bei RT gerührt. Das Produkt, (PDTP)<sub>m</sub>-Poly-Lysin-(Cy3)<sub>n</sub>, wurde durch

Ultrafiltration von den PDTP-Resten abgetrennt und anschließend in 100µl Wasser gelöst. Danach wurde 0.1ml TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zum Ansatz zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt, (HS-Propionat)m-Poly-Lysin-(Cy3)n, wurde mit 3.000 MWCO von den niedermolekularen Bestandteilen getrennt.

- 5 Das Produkt trägt mehrere reaktive SH-Gruppen, die leicht modifiziert werden können, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

### Beispiel 13:

TTP-3'-O-Propionat-SH, Fig 24A,

- 10 Die Synthese von 3'-modifizierten Nukleotiden erfolgt nach Gottikh et al. Tetrahedron, 1970, v. 26, 4419-, Schäfer et al. Method in Enzymology, 1986, v. 126, S. 682-.

- DTBP, 210 mg, wurden in 1ml DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurde CDI 320mg zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 10µl Methanol zugegeben und nach weiteren 10 min wurden 100µl dieser Lösung, 1mol/l, zu 300µl wässriger 100mmol/l-Lösung von TTP, pH 8.5 eingestellt mit NaOH, zugegeben und ca. 4 h bei RT kräftig gerührt. Die Nukleotide wurden durch Präzipitation mit Ethanol isoliert und dann in 300µl Wasser gelöst. Anschließend wurde 200µl TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zugegeben und nach 10 min bei RT erfolgt die wiederholte Präzipitation der Nukleotide. Die Trennung der modifizierten Nukleotide von den nicht modifizierten ist auf dieser Stufe nicht notwendig. Ausbeute 13%, UV-Vis.

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

### 25 Beispiel 14:

TTP-3'-Amino-PDTP, Fig 24B

Die Synthese erfolgte wie für dUTP-AA, Beispiel 1, beschrieben: Als Edukte wurden 3'-Amino-3'-Deoxy-TTP, 100µl, 10mmol/l Lösung, pH 8 und PDTP-NHS eingesetzt. Ausbeute 19%, UV-Vis.

30

Das Produkt trägt eine Disulfidbindung, die leicht an einer Thiolaustauschreaktion teilnehmen kann und somit an andere Verbindungen gekoppelt werden kann.

- Auch andere, am 3'-Ende mit einer Bindungsstelle, z.B. einem kurzen Linker, modifizierte Nukleotide können eingesetzt werden. Synthesen sind dargestellt beispielsweise in Metzker et al. Nucleic acid Research 1994, V.22, S. 4259, Canard et al. Gene, 1994, V. 148, 1, Hovinen et al. J. Chem. Soc. Perk. Trans. 1994V.1, S. 211, Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Jameson et al. Method in

Enzymology, 1997, V. 278, S. 363, Canard US. Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642, Faulstich DE 4418691.

Weitere Beispiele für basenmodifizierte Nukleotide, die als Nuk-Komponente  
5 verwendet werden können, sind in Balasubramanian WO 03048387 beschrieben. Noch  
weitere Beispiele für Nukleotid-Analoga sind in "Nucleotide Analogs" Scheit, 1980,  
ISBN 0-471-04854-2, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry", Kisakürek 2000, "Anti-  
HIV Nucleosides" Mitsuya, 1997, "Nucleoside Analogs in cancer therapy", Cheson,  
1997 angegeben. Ein Fachmann sollte erkennen, dass auch andere Nukleoside und  
10 Nukleotide verwendet werden können.

### **Beispiele für Kopplung von Linker-Komponenten und Marker-Komponenten an Nuk-Komponenten**

#### **Beispiel 15:**

15 dUTP-AA-SS-MEA-Cy3, Fig. 25

Zu 100µl, 10mmol/l MEA-Cy3 in 50mM Borat, pH 9.5, wurde 50µl 30mmol/l dUTP-AA-  
PDTP in 50mM Borat, pH 9.5 zugegeben. Nach 1 Stunde wurde das dUTP-AA-SS-MEA-  
(Cy3) durch Dünnschicht-Chromatographie, LM 1, Rf. 0.6, von MEA-Cy3, Rf. 0.9,  
getrennt. Anschließend wurde dUTP-AA-SS-MEA-(Cy3) auf RP-18 von dUTP-AA-PDTP  
20 getrennt. Ausbeute 67%, UV-Vis.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine  
niedermolekulare Marker-Funktionalität trägt.

Das Produkt ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-  
25 Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. Es kann  
stellvertretend für konventionell modifizierte Nukleotide mit nur einem  
niedermolekularen Marker auftreten.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase) als  
Substrat akzeptiert, s. Beispiel 34A.

#### **Beispiel 16:**

dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)2, Fig. 26

dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)2 wurde ähnlich wie dUTP-AA-SS-MEA-(Cy3), Beispiel 15,  
35 synthetisiert, dabei wurde TEAE-(Cy3)2-Propionat-SH anstatt von MEA-Cy3  
verwendet. Ausbeuten 43%, UV-Vis.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und zwei niedermolekulare Marker-Funktionalitäten trägt.

Das Produkt ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. Es kann stellvertretend für konventionell modifizierte Nukleotide mit mehreren niedermolekularen Markern auftreten.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des Nukleotids führt zum Verlust der Substrateigenschaften.

#### **Beispiel 17:**

dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3, Fig. 27

dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3 wurde ähnlich wie dUTP-AA-SS-MEA-Cy3, Beispiel 15, synthetisiert, dabei wurde Cy3-TEAE-Propionat-SH anstatt von MEA-Cy3 verwendet. Ausbeute 37%, UV-Vis.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und eine niedermolekulare Marker-Funktionalität. Der Linker an der Base hat eine freie Aminogruppe, die modifiziert werden kann.

Das Produkt ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. Das Nukleotid wird von Polymerasen als Substrat akzeptiert.

#### **Beispiel 18:**

**(dUTP-AA-SS-Propionat)<sub>m</sub>-Poly-Lysin-(Cy3)<sub>n</sub>**

Edukte:

dUTP-AA-PDTP

(HS-Propionat)<sub>m</sub>-Poly-Lysin-(Cy3)<sub>n</sub>, n = 10-15, m 3-9, Poly-Lysin 10.000-20.000

Zu 50µl einer Lösung mit dUTP-AA-PDTP, 20mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.0, wurde 20µl (HS-Propionat)<sub>m</sub>-Poly-Lysin-(Cy3)<sub>n</sub>, ca. 1mmol/l, in Wasser, gegeben und 18 h bei RT gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration, 30.000 MWCO, gereinigt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten trägt. Das Produkt der Reaktion ist

definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist unter 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.

- 5 Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des Nukleotids führt zum Verlust der Substrateigenschaften.

**Beispiel 19:**

dUTP-AA-PEG-Biotin, Fig. 28

- 10 Zu 100µl wässriger Lösung dUTP-AA, 50mmol/l, pH 8.0, wurden 10mg Biotin-PEG-NHS gegeben und bei 40°C 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das nicht umgesetzte Nukleotid durch Ultrafiltration, 3.000 MWCO, abgetrennt und das Produkt der Reaktion, das dUTP-AA-PEG-Biotin, mehrmals mit Wasser gewaschen.

- 15 Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. Biotin dient als Kopplungseinheit T. An diese Kopplungseinheit T können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, z.B. Streptavidin, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen.

- 20 Biotin kann auch als eine niedermolekulare Marker-Einheit mit signalvermittelnden Funktion betrachtet werden, die an den langen Linker gekoppelt ist.

- 25 Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromoleküls: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome und an die Kopplungseinheit T können weitere Makromoleküle gekoppelt werden.

- Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-dCTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP, 5-Amino-Propargyl-dUTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP (Fig. 29) können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.
- 30

In einer ähnlichen Weise können auch andere Polymere, z.B. PEG-Derivate, als Linker gekoppelt werden. Ein Beispiel dafür stellt dATP-PA-PEG-NH<sub>2</sub>.

- 35 Zu 100µl wässriger Lösung 7-Deaza-7-Aminopropargyl-dATP (hergestellt aus 7-(3-Phthalimido-1-propynyl)-2'-desoxy-7-deazaadenosin von Jena Bioscience), 50mmol/l, pH 8.0, wurden 10mg Fmoc-PEG-NHS (Fmoc-geschützter NH<sub>2</sub>-PEG-NHS) gegeben und bei 40°C 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 11 erhöht und die

Reaktionsmischung weitere 2 Stdunden bei RT gerührt. Anschließend wurde das nicht umgesetzte Nukleotid durch Ultrafiltration, 3.000 MWCO, abgetrennt und das Produkt der Reaktion, das dATP-PA-PEG-NH<sub>2</sub>, mehrmals mit Wasser gewaschen.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. NH<sub>2</sub>-Gruppe dient als Kopplungseinheit T für die Marker-Komponente. An diese Kopplungseinheit T können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, z.B. Polyacryl-säurederivate, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Nukleotid-Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen.

#### **Beispiel 20:**

TTP-3'-Amino-PEG-Biotin,

Die Synthese erfolgte ähnlich wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19. Als Edukte wurden 3'-Amino-3'-Deoxy-TTP und Biotin-PEG-NHS eingesetzt. Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker und eine niedermolekulare Marker-Einheit (Biotin), die eine signalvermittelnde Funktion hat. An das Biotin können makromolekulare signaltragende Streptavidin-Moleküle gekoppelt werden.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular.

Auch andere Nukleotid-Analoga mit einer Amino-Gruppe in der 3'-Position können in ähnlicher Weise gekoppelt werden.

#### **Beispiel 21:**

dCTP-PA-PEG-Maleimid,

Die Synthese erfolgte wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19, beschrieben. Als Edukte wurden dCTP-PA und Maleimid-PEG-NHS eingesetzt.

Diese Verbindung hat eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. Kopplungseinheit T an diesem Linker ist die Maleimid-Gruppe. An Maleimid-Funktionalität können makromolekulare signaltragende Moleküle gekoppelt werden, die eine oder mehrere SH-Gruppen tragen.

Maleimid-Gruppe kann auch als eine niedermolekulare Marker-Einheit mit signalvermittelnden Funktion betrachtet werden, die an den langen Linker gekoppelt ist.



Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromoleküls: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. An diese Marker-Komponente können  
5 makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Allylamino-  
10 dUTP, 5-Amino-Propargyl-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-  
Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

#### 15 **Beispiel 22:**

dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-(Cy3)-PEG-Biotin, Fig. 30

Die Synthese erfolgte ähnlich wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19 beschrieben. Als Edukte wurden dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3 und Biotin-PEG-NHS eingesetzt. Die  
Trennung vom nicht abreagierten dUTP-Analog erfolgte durch Ultrafiltration, 3.000  
20 MWCO.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität, einen Farbstoff, einen makromolekularen Linker und eine niedermolekulare Marker-Funktionalität (Biotin), die eine signalvermittelnde Funktion hat. Biotin kann auch als eine Kopplungseinheit T  
25 des Linkers betrachtet werden.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromoleküls: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, Biotin dient als Kopplungseinheit T. An diese Kopplungseinheit T können makromolekulare Strukturen  
30 gekoppelt werden, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen.

Der Farbstoff dient als sterisch anspruchsvolle Gruppe, die den enzymatischen Einbau von nur einem Nuk-Makromolekül in den wachsenden Strang durch die Polymrase  
35 zuläßt. Die Eigenschaften solcher Nukleotide sind detailliert in Tcherkassov WO 02088382 beschrieben.

#### **Beispiel 23:**

dUTP-AA-SS-PEG-Biotin, Fig. 31 A,

Zu 100µl, 10mmol/l Biotin-PEG-Ethyl-SH in 50mM Borat, pH 9.5, wurde 50µl  
30mmol/l dUTP-AA-PDTP in 50mM Borat, pH 9.5 zugegeben. Reaktion wurde 18  
Stunden bei RT gerührt. Die Trennung erfolgt ähnlich wie für die Synthese von dUTP-  
5 AA-PEG-Biotin, Beispiel 19 beschrieben.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen  
Linker. Biotin dient als Kopplungseinheit T. An diese Kopplungseinheit T können  
makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, z.B. Streptavidin, ohne dass die  
10 Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient  
als Substrat für Polymerasen. Über Streptavidin können auch weitere makromoleküle,  
beispielsweise Enzyme oder Nukleinsäureng gekoppelt werden.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-  
15 Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome.

Biotin kann auch als signalvermittelnde niedermolekulare Marker-Einheit bezeichnet  
werden.

20 Die Linker-Komponente kann zusammen mit der Marker-Komponente von der Nuk-  
Komponente unter milden Bedingungen abgespalten werden. Dies kann beispielsweise  
von Vorteil sein, wenn eine Sequenzierung durch Synthese (Balasubramanian WO  
03048387, Tcherkassov WO 02088382, Quake WO0132930, Kartalov WO02072892 )  
durchgeführt wird, wobei nach jedem Detektionsschritt eine Entfernung der Marker  
25 notwendig ist.

Ein weiteres Beispiel für die Nuk-Makromoleküle mit einer unter milden Bedingungen  
spaltbaren Gruppe: dUTP-AA-Propionat-S-CO-PEG-Biotin (Fig. 31 B).

Für diese Reaktion wurde das dUTP-AA-PDTP zunächst auf RP-HPLC in Wasser-  
30 Methanol-Gradient gereinigt.

Zu 10µl einer 50 mmol/l Lösung von dUTP-AA-PDTP in Wasser wurden 20 µl einer 100  
mmol/l Lösung von TCEP, pH 8, zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT 10 min  
durchgeführt. Das Produkt der Reaktion, das dUTP-AA-Propioat-SH, wurde von  
anderen Reagenzien auf präparativen Kieselgel-Platten, LM 2, getrennt. Das Produkt,  
35 dUTP-AA-Propionat-SH, bleibt auf der Startlinie. Es wurde von der Platte mit Wasser  
eluiert, eingengt und in 50 µl 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 8, aufgelöst.

Zu dieser Lösung wurden 50 µl einer frisch angesetzten 2 % wässrigen Lösung von  
Biotin-PEG-NHS zugegeben. Die Reaktion erfolgte be RT 30 min lang. Anschließend

wurde das Produkt der Reaktion, das dUTP-AA-Propionat-S-CO-PEG-Biotin, durch Ultrafiltration mit MWCO 3000 von niedermolekularen Reaktionskomponenten abgetrennt, fünf mal mit 0,5 ml Wasser gewaschen und in einem Volumen von 50 µl aufgelöst.

5

Das auf diese Weise erhaltene das dUTP-AA-Propionat-S-CO-PEG-Biotin kann von DNA-Polymerasen, beispielsweise Klenow-Fragment Exo minus oder Taq-Polymerase, in den wachsenden Strang der Nukleinsäuren eingebaut werden.

10 An das Biotin können über das Straptavidin weitere Marker-Komponenten gekoppelt werden.

Das das dUTP-AA-Propionat-S-CO-PEG-Biotin enthält eine unter milden Bedingungen spaltbare Gruppe, so dass der Linker mit dem Farbstoff von dem Nukleotid  
15 abgespalten werden kann. Dies ist beispielsweise in Verfahren der Sequenzierung durch die Synthese vom besonderen Interesse (Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382, Quake WO0132930, Kartalov WO02072892).

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-  
20 dCTP, 5-Amino-Propargyl-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-  
Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

25

#### **Beispiel 24:**

TTP-O-Propionat-SS-PEG-Biotin,

Zur 100µl Lösung von TTP-O-Propionat-SH, 10mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.5, wurden 100µl einer Lösung von Bis-Dithio-(Ethyl-PEG-Biotin), 0.5mmol/l, in Wasser  
30 gegeben und 24 Stunden bei RT gerührt. Die Aufreinigung erfolgte durch Ultrafiltration mit 3.000 MWCO ähnlich wie in Beispiel 19.

Beispiele für die Kopplung von Aminogruppen an die Phosphatreste der Nukleotide sind in D. Jameson et al. Methods in Enzymology 1997, V. 278, 363 angegeben. An  
35 diese Amino-Gruppe kann eine Linker-Komponente gekoppelt werden. Beispiele für Kopplungen von Linkern an Phosphat-Gruppen von Nukleotiden sind in US Patent 5.981.507 dargestellt. An einen solchen Linker können weitere makromolekulare

Linker gekoppelt werden, die einen niedermolekularen Marker oder eine niedermolekulare Kopplungseinheit oder einen makromolekularen Marker tragen.

In einer Ausführungsform wird makromolekularer Linker an die Phosphat-Gruppen angefügt, die an der 5'-Position der Ribose gekoppelt sind. Die Kopplung erfolgt

5 vorzugsweise an der Gamma-Phosphat-Gruppe der Nukleotide, wobei sowohl Ribonukleotide als auch 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Dideoxynukleotide eingesetzt werden können.

In einer anderen Ausführungsform erfolgt die Kopplung des makromolekularen Linker an die 3'-Phosphat-Gruppe eines 5'-Nukleosid-Triphosphat. Synthese eines solchen

10 Derivaten ist in WO 91/06678 dargestellt.

### **Kopplungen an Marker-Komponenten**

#### **Beispiel 25, :**

(dUTP-16-Biotin)4-SA,

15 Zu 200µl einer Lösung von Biotin-16-dUTP 200µmol/l in 50mM Tris-HCl, pH 8.0, wurden 200µl einer Streptavidin-Lösung, 1mg/ml, in 50mM Tris-HCl, pH 8.0, zugegeben. Nach 1 Stunde bei RT wurde das (dUTP-16-Biotin)4-SA vom nicht umgesetzten Biotin-16-dUTP durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, abgetrennt.

20 Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten trägt.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Es kann stellvertretend für konventionell modifizierte Nukleotide mit  
25 einem makromolekularen Markern betrachtet werden.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation führt zum Verlust der Substrateigenschaften, s. Beispiel 34B.

30 Eigenschaften der Biotin-Streptavidin-Bindung sind z.B. in Gonzalez et al. Journal Biolog. Chem. 1997, v. 272, S. 11288 beschrieben.

#### **Beispiel 26:**

(dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy2,

35 Die Kopplung von dUTP-16-Biotin an SA-Cy2 wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt.

Die Verbindung dient als Äquivalent zu Verbindung aus Beispiel 25, wobei zur Visualisierung Streptavidin fluoreszent markiert ist.

### Beispiel 27:

dCTP-PA-SS-Oligo-dT30,

- 5 Die Synthese erfolgte wie bei dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 beschrieben. Zu dCTP-PA-PDTP, 100µl, 20mmol/l, wurde Oligo-dT30-3'-SH (MWG-Biotech) zugegeben, Endkonzentration 200µmol/l, und 18 Std bei RT, pH 9, gerührt. Die Aufreinigung erfolgte durch Ultrafiltration mit 3.000 MWCO.

- 10 Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid-Analog: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des

- 15 Nukleotidteils führt zu Aufhebung der Substrateigenschaften.

### Beispiel 28:

(dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2 und (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA, Fig. 32

- 20 Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-Cy2 bzw. an SA wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt. Zu 200µl 1µg/µl Streptavidin wurden 10µl einer Lösung von dUTP-AA-PEG-Biotin, ca. 1mmol/l, gegeben, und bei RT 1 h gerührt. Danach wurde das Produkt durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, von dem nicht gekoppelten dUTP-AA-PEG-Biotin abgetrennt und das Produkt 2 mal mit Wasser gewaschen.

25

Ein Teil des gewonnenen (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2 wurde mit Cy3-NHS modifiziert: 50µl (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2 wurden in 50mmol/l Borat, pH 8.5, aufgelöst, bis zur Konzentration von 1.4µg/µl, und anschließend mit Cy3-NHS versetzt. Endkonzentration von Cy3 betrug 10mmol/l. Die Reaktion wurde 1 Std. bei

30 RT durchgeführt. Das Produkt, (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2/Cy3, wurde durch Ultrafiltration mit 30.000 MWCO getrennt.

Dadurch wurde ein Nuk-Makromolekül hergestellt, dass sehr wenige freie Amino-Gruppen am Marker-Teil aufweist.

- 35 Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Es kann stellvertretend für Nuk-Makromoleküle betrachtet werden.

- 5 Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert s. Beispiel 34,35.

Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül tragen, s.Beispiele 20, 22, 23, 24, können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

10

#### **Beispiel 29:**

(dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Alkalische Phosphatase, Fig.33, und (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-QDot, Fig. 34,

- 15 Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-AP bzw. QDot wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt.

Im Falle von QDot werden Nuk-Linker-Teile an der Oberfläche der QDots angeordnet. Es wurden Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente mit einem

- 20 Enzym bzw. Q-Dots trägt.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

- 25 Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül tragen, s.Beispiele 20, 22, 23, 24, können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

#### **Beispiel 30:**

(dUTP-AA-PEG-Biotin)2-(dT31-TEG-Biotin)2- SA-Cy2, , Fig. 35A

- 30 Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-Cy2 wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt:

Zu 100µl einer Streptavidin-Cy2-Lösung, 20µmol/l (1.2mg/ml), in Tris-HCl, 50mmol/l, pH 8, wurden 80µl 80µmol/l dT31-3'-TEG-Biotin (MWG Biotech) zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. (TEG ist ein kurzer Linker zwischen Biotin und dT31). Danach

- 35 wurden 100µl einer Lösung dUTP-AA-PEG-Biotin 50µmol/l in 50mM Tris-HCl, pH 8.0, zugegeben. Nach 10 min bei RT wurde (dUTP-AA-PEG-Biotin)2-(dT31-TEG-Biotin)2-SA-Cy2 durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, gereinigt.

- Die Substanz trägt eine Nukleosid-Triphosphat-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten (Oligo-dT31). Das Oligo-dT31 besteht aus Nukleosidmonophosphaten, die allerdings an der enzymatischen Reaktion nicht teilnehmen und nur eine signalvermittelnde Funktion haben. An ein solches
- 5 Oligonukleotid können komplementäre Nukleinsäuren hybridisiert werden, die eine signalgebende Funktion haben (Fig. 35B). (allgemeine Regeln zur Hybridisierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt, Anderson "Nucleic Acid Hybridization", 1999).
- 10 Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.
- 15 Dieses Derivat kann beispielsweise an Poly-dA oder poly-A (z.B. mit durchschnittlicher Länge 260NT, Amersham Bioscience) durch Hybridisierung gekoppelt werden. Sowohl ein einziges als auch mehrere (dUTP-AA-PEG-Biotin)<sub>2</sub>-(dT31-Biotin)<sub>2</sub>-SA-Cy2 Moleküle können an ein Poly-dA-Molekül gekoppelt werden, s.auch Fig. 5. Das Verhältnis wird durch die Konzentrationsverhältnisse bestimmt. Auch andere
- 20 Oligonukleotide, beispielsweise markiert mit Farbstoffen, können zusammen mit(dUTP-AA-PEG-Biotin)<sub>2</sub>-(dT31-Biotin)<sub>2</sub>-SA-Cy2 an denselben Strang der Poly-dA oder poly-A gekoppelt werden, wobei die Verhältnisse zwischen einzelnen Molekülen variabel sind. Dadurch ist es möglich, ein polyfunktionales Nuk-Makromolekül herzustellen. Der große Vorteil eines solchen Nuk-Makromoleküls besteht in einer
- 25 leicht spaltbaren makromolekularen Markierung: die an die poly-dA bzw. poly-A Stränge hybridisierten markierten Oligonukleotide können durch Denaturierung abgelöst werden. Durch die Wahl der Länge der markierten Oligonukleotide, kann die T<sub>m</sub> dieser Oligonukleotide für die jeweiligen Anforderungen der reversiblen Markierung angepasst werden. Die Regeln zur T<sub>m</sub>-Berechnung sind dem Fachmann bekannt
- 30 ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, band 1-3, 2001). Beispielsweise können dT<sub>25</sub>-Oligonukleotide, markiert mit einem Cy3-Molekül an Poly-dA gekoppelt werden. Durch den Einsatz von RNA, z.B. poly-A, zur Bindung mehrerer (dUTP-AA-PEG-Biotin)<sub>2</sub>-(dT31-Biotin)<sub>2</sub>-SA Moleküle, kann die Spaltung durch eine RNase erfolgen.
- 35 Da Streptavidin 4 Bindungsstellen für Biotin hat, entsteht ein Gemisch von Nuk-Makromolekülen, bei dem 4 Bindungsstellen unterschiedlich besetzt sind. Dieses Gemisch kann mit unterschiedlichen Mitteln getrennt werden. Eine der Möglichkeiten besteht in Isolierung von Nuk-Makromolekülen, die mindestens ein Oligo-dT31 tragen,

beispielsweise durch eine Absorption an einem Anionenaustauscher (z.B. einer DEAE-Cellulose-Säule). Auf Gel-Elektrophorese eignet sich zur Trennung einzelner Derivate.

Auch längere Nukleinsäureketten, die ein Biotin-Molekül tragen, beispielsweise poly-dA-Biotin, hergestellt beispielsweise durch eine terminale Kopplung von ddUTP-18-Biotin durch eine TdT-abhängige Reaktion ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, Band 1-3, 2001), können in ähnlicher Weise an das Streptavidin gekoppelt werden, so dass Moleküle mit einer durchschnittlichen Zusammensetzung von  $(\text{dUTP-AA-PEG-Biotin})_N$ - $(\text{Nukleinsäureketten-Biotin})_M$ -SA entstehen. Sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Nukleinsäureketten können gekoppelt werden. Die Länge der gekoppelten Nukleinsäureketten kann zwischen 10 und 100, 100 und 1000 Nukleotiden liegen.

Die hybridisierten Oligonukleotide, die einen Farbstoff tragen, können an den Poly-dA Strang auch kovalent durch Cross-Linker gebunden werden.

Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül tragen, s. Beispiele 20, 22, 23, 24, können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

#### **Beispiel 31:**

$(\text{dUTP-AA-SS-PEG-Biotin})_4$ -SA und  $(\text{dUTP-AA-SS-PEG-Biotin})_4$ -SA-Cy2, Fig. 36

Die Kopplung von dUTP-AA-SS-PEG-Biotin an SA bzw. an SA-Cy2 wurde wie für  $(\text{dUTP-AA-PEG-Biotin})_4$ -SA beschrieben durchgeführt. Als Edukte wurden Streptavidin und dUTP-AA-SS-PEG-Biotin eingesetzt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt. Die Linker-Komponente und die Marker-Komponente können von der Nuk-Komponente unter milden Bedingungen abgespalten werden.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Es kann stellvertretend für Nuk-Makromoleküle betrachtet werden, die eine unter milden Bedingungen spaltbare Verbindung in der Linker-Komponente tragen.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert s. Beispiel 34.



### Beispiel 32:

dCTP-PA-PEG-Maleimid-S-Oligo-dT30, Fig. 37A

Zu 100µl einer Lösung mit dCTP-PA-PEG-Maleimid, 5mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.5, wurde 100µl einer Lösung von 3'-SH-Oligo-dT30, 200µmol/l, in Wasser zugegeben und 48 Std. bei RT gerührt. Das Produkt wurde mittels präparativer Gel-Elektrophorese, 12% Polyacrylamid-Gel, gereinigt.

Die Substanz trägt eine Nukleosid-Triphosphat-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten (Oligo-dT30). Das Oligo-dT30 besteht aus Nukleotiden, die allerdings an der enzymatischen Reaktion nicht teilnehmen und nur eine signalvermittelnde Funktion haben. An ein solches Oligonukleotid können komplementäre Nukleinsäuren hybridisiert werden, die eine signalgebende Funktion haben (Fig. 37B). (allgemeine Regeln zur Hybridisierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt, Anderson "Nucleic Acid Hybridization", 1999.)

Das Nukleotid ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Allylamino-dUTP, 5-Amino-Propargyl-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

Durch Zugabe von Poly-dA oder Poly-A können mehrere dCTP-PA-PEG-Maleimid-S-Oligo-dT30, z.B. 10-20, zu einem Nuk-Makromolekül gekoppelt werden. Dabei entsteht ein Nuk-Makromolekül mit linear angeordneten Nuk-Linker-Komponenten (Fig. 37 C).

### Beispiel 33 :

(dCTP-PA-PEG-Maleimid-S)<sub>n</sub>-Poly-Lysin-(Cy3)<sub>m</sub>,

Edukte: dCTP-PA-PEG-Maleimid

(HS-Propionat)<sub>m</sub>-Poly-Lysin-(Cy3)<sub>n</sub>, n = 10-15, m 3-9, Poly-Lysin 10.000-20.000

Zu 100µl einer Lösung mit dCTP-PA-PEG-Maleimid, 5mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.5, wurde 20µl einer Lösung von (HS-Propionat)<sub>m</sub>-Poly-Lysin-(Cy3)<sub>n</sub>, ca. 1mmol/l, in

Wasser, gegeben und 18 Std. bei 40°C gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration, 30.000 MWCO, gereinigt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt. Pro Nuk-Makromolekül sind mehrere Nuk-Komponenten gekoppelt. Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

Weitere Kombinationen von Nuk-Komponenten, Linker-Komponenten und Marker-Komponenten sind dem Fachmann naheliegend.

#### **Vergleich von Substrateigenschaften einiger Vertreter von Nuk-Makromolekülen mit konventionell modifizierten Nukleotiden.**

Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle gegenüber Polymerasen und Terminale deoxy-Nucleotidyl-Transferase (TdT) wurden mit den Eigenschaften der konventionell modifizierten Nukleotide in einer Markierungsreaktion verglichen. Allgemeine Prinzipien von Markierungsreaktionen findet man in "Molecular-Cloning", J. Sambrook, Band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5.

#### **Beispiel 34: Substrateigenschaften von Nuk-Makromolekülen oder konventionell modifizierten Nukleotiden gegenüber Polymerasen**

Dieses Beispiel soll nicht zur Einschränkung der möglichen Markierungsreaktionen dienen, sondern lediglich Unterschiede in den Substrateigenschaften verdeutlichen.

In den Reaktionen wurden sowohl selbst synthetisierte als auch kommerziell erhältliche modifizierte Nukleotide dUTP-Cy3 (Amersham) und dUTP-16-Biotin (Roche) verwendet. Nicht modifizierte dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) wurden bei der Firma Roth erworben.

Als Matrizen dienten sowohl kurze Oligonucleotide als auch poly-dA. Primer und Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech synthetisiert.

Reaktionen wurden in 20mmol/l Tris-Puffer, pH 8.5, 5mmol/l  $MgCl_2$ , 10% Glycerin, durchgeführt. Die Konzentrationen der Primer betrugen 1 $\mu$ mol/l, die der Oligonukleotide 1 $\mu$ mol/l und die Konzentration der poly-dA, 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l (für die Konzentrationsverhältnisse an der festen Phase s.u.). Als Polymerase wurde Klenow  
5 Exo minus 1Unit /100 $\mu$ l (Amersham) verwendet. Die Konzentrationen von Nukleotiden betrugen 20 $\mu$ mol/l für konventionell modifizierte Nukleotide und 5  $\mu$ mol/l für Nuk-Makromoleküle. Nicht modifizierte Nukleotide wurden in Konzentrationen von 50 $\mu$ mol/l eingesetzt.

10 Zunächst wurden Primer an die jeweilige Matrize hybridisiert: Das Reaktionsgemisch ohne Polymerase wurde auf 75°C erhitzt und über 5 min auf 37°C abgekühlt. Danach wurde die Polymerase zugegeben. Alle Reaktionen wurden über 1 h bei 37°C durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration von 10mmol/l) gestoppt.

15 Zu einigen Ansätzen wurde nach dem Stop der Reaktion Streptavidin, bis zu Endkonzentration von 1mg/ml, zugegeben und der Ansatz weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Dadurch können bereits eingebaute Nukleotide, die ein Biotin tragen, mit Streptavidin reagieren und somit Streptavidin und Oligonukleotid verbinden. Diese  
20 Experimente eignen sich als Kontrolle für die Laufeigenschaften von modifizierten Primern.

Zu entsprechend gekennzeichneten Ansätzen wurde Mercaptoethanol (bis 20mmol/l Endkonzentration) zugegeben und der jeweilige Ansatz wurde 10 min bei 37°C  
25 inkubiert. Mercaptoethanol wurde bei einigen Ansätzen während, bei anderen Ansätzen auch nach der Reaktion zugegeben.

Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels denaturierender Gel-Elektrophorese, 20% Polyacrylamid-Gel, 50mmol/l Tris-HCl, pH 8.7, wie in "Gel electrophoresis of nucleic  
30 Acids", Ed. D. Rickwood, 1990, dargestellt. Zur Denaturierung der Proben wurde anstatt von 7M Urea eine erhöhte Temperatur bei der Gelelektrophorese eingesetzt (60°C). Die Elektrophorese wurde in Biorad-Gelkammern (Protean 3) durchgeführt, 200V, ca. 1h. Die Visualisierung erfolgte auf einer UV-Vis Gel-Dokumentationsanlage (Biorad).

35

### Beispiel 34A, Fig. 38

#### Darstellung des Einbaus und Spaltung von einem konventionell modifizierten Nukleotid (dUTP-AA-SS-MEA-Cy3)

##### 5 Sequenzen:

Primer:

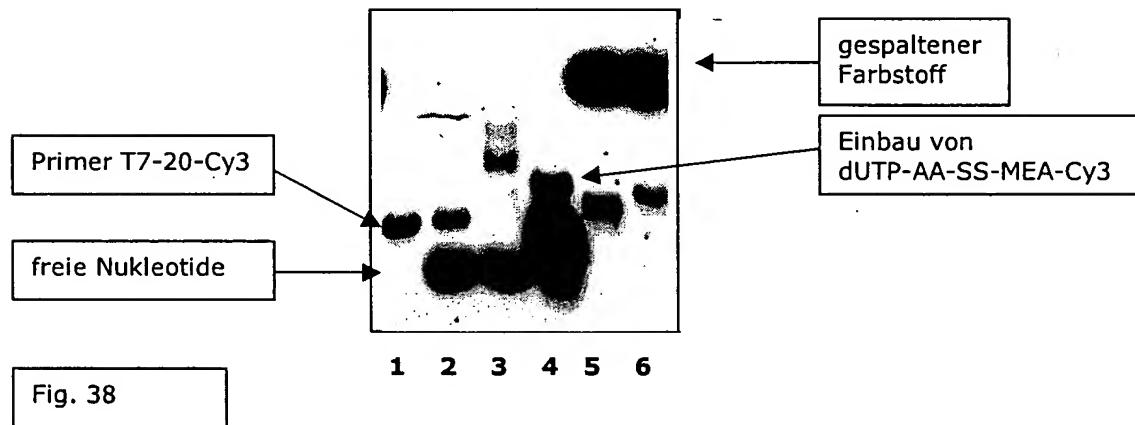
Primer-T7-20-5'-Cy3: 5' - Cy3-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Matrize:

Oligonukleotid

10 Oligo 1: 5'-AGTTTTAGTTTTACCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

Die Primer-Bindungsstelle ist unterstrichen



##### Legende:

Spuren 1-6:

- 15 1) nur PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1
- 2) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dCTP-Cy3 + dATP + dGTP+ Polymerase
- 3) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dCTP-Cy3 + dATP + dGTP + dTTP+ Polymerase
- 4) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 + Polymerase
- 5) nach 1 Std. wurde zu einem Aliquot von Ansatz 4 Mercaptoethanol zugegeben und
- 20 weitere 10 min inkubiert, es erfolgt eine Abspaltung der Markierung
- 6) nach 10 min wurde zum Aliquot von Ansatz 5 dATP, dGTP zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert

Wie man sieht, wird dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 von der Polymerase eingebaut (Spur 4).

- 25 Der Farbstoff kann vom Primer abgespalten werden (Spur 5) (man sieht eine Verschiebung der Bande, die durch die geringere Größe von Oligonukleotid zu begründen ist). Anschließend können weitere Nukleotide eingebaut werden (Spur 6).

Ein ähnlich durchgeführter Reaktionsansatz mit dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)<sub>2</sub> führte nicht zum Einbau des Nukleotid-Analogs in den Primer.

5 Dieses Beispiel zeigt, dass sogar geringfügige Veränderungen in der Analog-Struktur, wie z.B. Verdopplung der Zahl der Farbstoffe, die an ein Nukleotid gekoppelt sind, zu Veränderung in Substrateigenschaften der Nukleotide führen können.

### Beispiel 34B, Fig. 39

#### Vergleich von Substrateigenschaften eines konventionell modifizierten

#### 10 Nukleotid mit einem makromolekularen Marker und einem Nuk-Makromolekül

#### Sequenzen:

Primer:

Primer-dT<sub>35</sub>-5'-Cy3 (dT35-Cy3): 5' Cy3-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

15 Matrize:

Poly-dA (Amersham), durchschnittlich 270 Nukleotide lang.

Nukleotide: (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)<sub>4</sub>-SA, (dUTP-16-Biotin)<sub>4</sub>-SA, dUTP-16-Biotin.

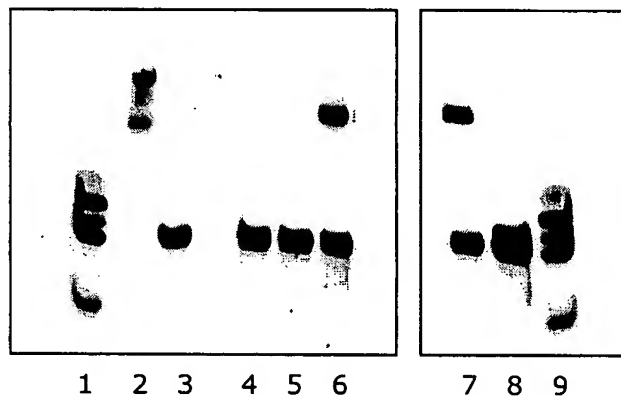


Fig. 39

#### Legende:

20 Spuren 1-9:

1) Leiter: T-7-20-Cy3, dT35-Cy3, dT40-Cy3, dT50-Cy3

2) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)<sub>4</sub>-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase

3) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)<sub>4</sub>-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA

4) (dUTP-16-Biotin)<sub>4</sub>-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase

25 5) (dUTP-16-Biotin)<sub>4</sub>-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA

6) (dUTP-16-Biotin)<sub>4</sub>-SA-Cy3 + dT35-Cy3 + Poly-dA

Im Kontroll-Ansatz, Spuren 7-9:

- 7) dUTP-16-Biotin + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase, Inkubation 1 std. 37°C  
danach + EDTA bis 10mmol/l Endkonzentration, danach + Streptavidin 10 min 37°C
- 8) dUTP-16-Biotin + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase, Inkubation 1 std. 37°C  
danach + EDTA bis 10mmol/l Endkonzentration,
- 5 9) Leiter: T-7-20-Cy3, dT35-Cy3, dT40-Cy3, dT50-Cy3

Ein Nuk-Makromolekül, (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA, wird in den Primer eingebaut (Spur 2). Der markierte Primer hat nach dem Einbau eines Nuk-Makromoleküls eine stark veränderte elektrophoretische Beweglichkeit. Bloße Anwesenheit von Nuk-Makromolekülen hat keinen Einfluß auf den Primer (Spur 3).

10

Ein konventionell modifiziertes Nukleotid, (dUTP-16-Biotin)4-SA, mit einem makromolekularen Marker wird nicht in den Primer eingebaut (Spur 4). Trotz der Anwesenheit der Polymerase in Reaktion 4 (Spur 4) lassen sich keine Unterschiede zwischen Spur 4 und Spur 5 feststellen.

15

Spur 6 zeigt die Position des konventionell modifizierten Nukleotids mit einem makromolekularen Marker, (dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy3, die obere Bande, und die Position des markierten Primers (die untere Bande).

20

Spur 7 zeigt das Ergebnis des Einbaus von dUTP-16-Biotin mit einer nachfolgenden Reaktion mit dem Streptavidin: die mit Biotin markierten Primer reagieren mit Streptavidin und verändern ihre Laufeigenschaften. Die nicht modifizierten Primer behalten ihre elektrophoretischen Eigenschaften bei.

25

Spur 8 zeigt das Ergebnis der Einbaureaktion eines konventionell modifizierten Nukleotides, dUTP-16-Biotin. Man sieht eine verbreitete Primer-Bande, die durch den Einbau von dUTP-16-Biotin in den Primer zustande kommt. Die Verlängerung von Primer ist eingeschränkt, da dUTP-16-Biotin nicht unbegrenzt nacheinander eingebaut werden kann, durchschnittlich wird ca. 3 dUTP-Analoga eingebaut, so dass die Länge von Primer durchschnittlich auf 38 NT ansteigt. Erwartungsgemäß führt der Einbau von konventionell modifizierten Nukleotiden mit einem niedermolekularen Marker nicht zu einer starken Veränderung in der elektrophoretischen Mobilität der Primer.

30

35 In diesem Experiment wurden Eigenschaften der Nuk-Makromoleküle, (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA, mit denen der Konventionell modifizierten Nukleotide verglichen. Man sieht deutlich, dass die Kopplung eines makromolekularen Markers an ein kommerziell erworbenen dUTP-16-Biotin zum vollständigen Verlust der

Substrateigenschaften der Nukleotide führt. Spuren 7 und 8 zeigen allerdings, dass die Polymerase sehr wohl in der Lage ist, dUTP-16-Biotin ohne makromolekularen Marker in den Primer einzubauen. Die Koppung von Streptavidin an das Biotin nach der Einbaureaktion führt zu genannten Veränderungen in Primer-Eigenaschaften.

5

Im Gegensatz dazu können Nuk-Makromoleküle (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA in den Primer ohne Schwierigkeiten durch die Polymerasen eingebaut werden. Das Auftreten von mehreren Banden im Gel führen die Erfinder auf einen mehrfachen Einbau von Nuk-Makromolekülen in den Primer (3 Banden) zurück.

10

#### **Beispiel 34C, Fig. 40:**

#### **Vergleich von Substrateigenschaften von Nuk-Makromolekülen, Einbau-Reaktion in der Lösung und an einer festen Phase**

#### **15 Sequenzen:**

Primer: (dT35-Cy3)

Primer-dT-35-5`-Cy3: 5` Cy3-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3`

Matrize:

Poly-dA (Amersham), durchschnittlich 270 Nukleotide lang.

20

Oligo-dA50-3`-TEG-Biotin (MWG-Biotech)

Nukleotide: (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA, (dU-AA-PEG-Biotin)4-SA

Streptavidin-polystyrene Particle, 2.17µ, Spherotech Inc,

#### **Vorbereitung von Streptavidin-polystyrene Particle (feste Phase).**

25

Drei Ansätze wurden in gleicher Weise vorbereitet.

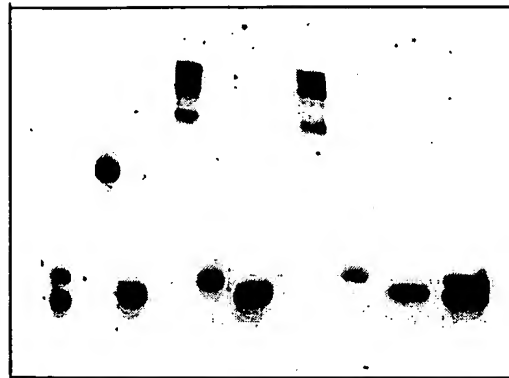
Je 0.5 ml der Lösung mit Kügelchen (im Hersteller-Puffer) wurde kurz zentrifugiert und Kügelchen-Pellet wurde in 100µl Einbaupuffer (20 mmol/l Tris, pH 8.5, 5mmol/l MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Anschließend wurden 100µl Oligo-dA50-3`-TEG-Biotin Konz. 50µmol/l zugegeben und 1 h bei RT gerührt. In dieser Zeit binden die Oligo-dA-

30

Moleküle an die Kügelchen. Anschließend wurden Kügelchen kurz abzentrifugiert und drei mal im Einbaupuffer gewaschen. Endvolumen der festen Phase beträgt je 100µl. Diese Menge an Oligo-dA50-feste-Phase kann Primer-dT-35-Cy3 in 2µmol/l hybridisieren.

Die Hybridisierung von Primer-dT-35-Cy3 erfolgte bei 40°C 10 min, mit anschließender

35 Abkühlung auf RT innerhalb von 10 min. Alle anderen Schritte wurden gleich bei allen Ansätzen durchgeführt.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

### Legende:

Spuren 1-10:

1) Leiter: dT35-Cy3, dT40-Cy3,

### 5 Reaktionen in der Flüssigphase:

2) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase

3) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA

4) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA

10 5) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA, anschließend + Mercaptoethanol bis zu 200mmol/l (Endkonzentration), für 30 min.

6) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA + EDTA

### Reaktionen an der Festphase:

15 7) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase+ Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA

8) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase + Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA, anschließend + Mercaptoethanol bis zu 200mmol/l (Endkonzentration), für 30 min.

20 9) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase, vor Elektrophorese + EDTA

10) Leiter: dT35-Cy3, dT40-Cy3,



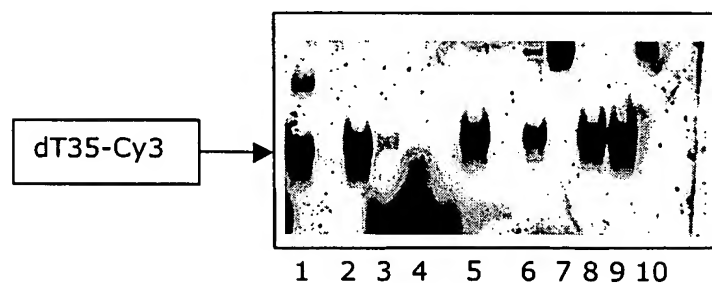
Man sieht deutlich das Ergebnis der Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen in Spuren 2,4,5,7,8. Sowohl in der Lösung, als auch an der festen Phase läuft die enzymatische Markierungsreaktion gut ab.

- 5 Nach Zugabe von Mercaptoethanol zu mit EDTA gestoppten Reaktionen erfolgt die Abspaltung von Linker-Komponenten mit dem gebundenen Streptavidin von den Primern. Dies führt zu Wiederherstellung der elektrophoretischen Eigenschaften der Primer. Die Verschiebung der Primer-banden in Spuren 5 und 8 ist durch multiplen Einbau von Nuk-Makromolekülen in die Primer zu begründen. Tatsächlich, liegen die Primer-Banden nach der Spaltung in Höhe von dT40-Cy3 (s. Leiter). Dies bedeutet,
- 10 dass bis zu 5 Nuk-Makromolekülen während der Reaktion in die Primer eingebaut wurden.

**Beispiel 35, Fig. 41:**

- Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle und konventionell**
- 15 **modifizierter Nukleotide gegenüber Terminaler Transferase (TdT).**

- Die Reaktion wurde nach Angaben des Kit-Herstellers (Roche) durchgeführt: Auf jeweils 50µl Volumen wurden zugegeben: 10µl 5x Reaktionspuffer, 1µl TdT (25Units), 5µl 25mmol/l CoCl<sub>2</sub>. Die Primer- und Nukleotid-Konzentrationen waren wie bei den
- 20 Polymerase-Reaktionen. Die Reaktion wurde für 2 h bei 37°C durchgeführt.
- Primer: Primer-dT<sub>35</sub>-5'-Cy3 (dT35-Cy3), Primer-dT<sub>35</sub> (dT35)



Legende:

- 25 1) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + TdT  
2) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3  
3) dUTP-Cy3 (Amersham)+ dT35 + TdT

- 4) dUTP-Cy3 (Amersham)+ dT35
- 5) dUTP-16-Biotin (Roche) + dT35-Cy3 + TdT;
- 6) Ansatz 5; nach dem Stop + Streptavidin
- 7) Streptavidin -Cy2
- 5 8) (dUTP-16-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + TdT
- 9) (dUTP-16-Biotin)4-SA + dT35-Cy3
- 10) (dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy2

In der Spur 1 sieht man deutlich 2 Banden, die Bande in der Mitte entspricht dem dT35-Cy3, die obere Bande entspricht dem Reaktionsprodukt: Nuk-Makromolekül wurde in dT35 durch TdT eingebaut. Spur 2 dient als Negativkontrolle. In Spur 3 sieht man das Ergebnis der Markierung des dT35 mit dem konventionellen Nukleotid dUTP-Cy3, Spur 4 ist die Negativkontrolle. In Spur 5 ist das Ergebnis der Kopplung von dUTP-16-Biotin an die dT35-Cy3 schlecht zu erkennen. In Spur 6 sieht man allerdings eine schwache Bande im oberen Bereich, die dem Ergebnis der Reaktion des mit dUTP-16-Biotin modifizierten Primers mit Streptavidin entspricht. Spur 7 zeigt die Position des modifizierten Streptavidins. In Spur 8 und 9 sieht man nur eine Bande in der Mitte des Gels, die dem dT35-Cy3 entspricht, im oberen Gel-bereich ist keine Bande zu sehen, was eindeutig darauf deutet, dass konventionell modifizierten Nukleotide mit einem makromolekularen Marker von TdT nicht eingebaut werden. Spur 10 zeigt die Position des (dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy2 im Gel.

### **Beispiel 36:**

dUTP-AA-SS-PEG-Cy3, Fig. 42 A

Zunächst wurde SH-PEG-Cy3 hergestellt. Zu 200 µl einer 10 mmol/l Lösung von Diamin-PEG (6kDa, Fluka) in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 8, wurde Cy3-NHS (Amersham-Bioscience) bis zu Endkonzentration von 15 mmol/l zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT 30 min lang durchgeführt. Anschließend wurde NH<sub>2</sub>-PEG-Cy3 (Fig. 42 B) von Farbstoffresten durch Ultrafiltration mit MWCO 3000 abgetrennt, 3 mal mit 1 ml 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 8, gewaschen und in einem Volumen von 200 µl 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 8, aufgelöst.

Zu dieser Lösung wurde PDTP-NHS bis zu Endkonzentration von 50 mmol/l zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT 30 min lang durchgeführt. Anschließend wurden 50 µl einer 1 mol/l Lösung von NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8, zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde weitere 60 min inkubiert. Zur Reduktion der Disulfidbindungen wurden 100 µl einer 1 mol/l TCEP-Lösung, pH 8, zum Reaktionsgemisch zugegeben. Nach 5 min bei RT wurde das Produkt der Reaktion, das SH-PEG-Cy3, von den niedermolekularen Komponenten durch Ultrafiltration mit MWCO

3000 abgetrennt, 5 mal mit 1 ml 50 mmol/l Tris-HCl-Puffer, pH 7, gewaschen und in einem Volumen von 200 µl 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7, aufgelöst. Unmittelbar vor Kopplung des Nukleotid-Teils wurde der pH-Wert auf 9.0 mit 1 mol/l NaOH eingestellt.

5 **Kopplung des SH-PEG-Cy3 an den Nukleotid-Teil:**

Zu 100 µl 20 mmol/l dUTP-AA-PDTP in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9, wurden 100 µl der Lösung mit SH-PEG-Cy3 in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 9.0, zugegeben. Reaktion wurde bei RT über 30 min durchgeführt. Das Produkt der Reaktion wurde durch Ultrafiltration mit MWCO 3000 von niedermolekularen Komponenten abgetrennt, 5 mal  
10 mit 1 ml 50 mmol/l Tris-HCl-Puffer, pH 7, gewaschen und in einem Volumen von 200 µl 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7, aufgelöst.

Das auf diese Weise erhaltene dUTP-AA-SS-PEG-Cy3 kann von DNA-Polymerasen, beispielsweise Klenow-Fragment Exo-minus oder Taq-Polymerase, in den wachsenden  
15 Strang der Nukleinsäuren eingebaut werden.

Das dUTP-AA-SS-PEG-Cy3 enthält eine unter milden Bedingungen spaltbare Gruppe, so dass der Linker mit dem Farbstoff von dem Nukleotid abgespalten werden kann. Dies ist beispielsweise in Verfahren der Sequenzierung durch die Synthese vom  
20 besonderen Interesse (Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382, Quake WO0132930, Kartalov WO02072892).

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-  
25 dCTP, 5-Propargylamino-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

30 **Beispiel 37:**

dUTP-R-CO-S-PEG-Biotin Fig. 43

Das dUTP-R-COOCH<sub>3</sub> (Fig. 44) wurde analog zur Vorschrift (Heike A. Held, Abhijit Roychowdhury, and Steven A. Benner, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, Vol 22,391-404 (2003)) synthetisiert. Die Triphosphatsynthese erfolgte nach T. Kovacs, L.  
35 Ötvös, Tetrahedron Letters, Vol 29, 4525-4588 (1988)).

500 mg (1.41 mmol) 5-Iod-2'-Deoxyuridin wurden bei Raumtemperatur in 10 ml wasserfreiem DMF unter Stickstoffatmosphäre suspendiert und 10 min. gerührt. Nun gibt man 160 mg (0.14 mmol) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) zu. Nach

weiteren 10 min gibt man nacheinander 400 µl Triethylamin, 480 mg (4.28 mmol) Pent-1-insäuremethylester und 55 mg (0.29 mmol) Kupfer-(I)-iodid zu. Nach 15 h wird die Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer eingeengt und das erhaltene rote Öl chromatographisch an Kieselgel gereinigt (Dichlormethan : Methanol = 20 : 1).  
5 Man erhält 400 mg (84%) Produkt. Nach Triphosphorylierung wurde dUTP-R-COOCH<sub>3</sub> erhalten.

In ähnlicher Weise können auch andere Basen wie Cytosin, Adenosin und Guanosin-Derivaten mit dem Pent-1-insäuremethylester modifiziert werden (Dissertation  
10 "Synthese basenmodifizierter Nukleosidtriphosphate und ihre enzymatische Polymerisation zu funktionalisierter DNA", Oliver Thum, Bonn 2002).

Weitere Modifikation erfolgt am dUTP-R-COOCH<sub>3</sub>:

Zu 100 µl einer 50 mmol/l Lösung der dUTP-R-COOCH<sub>3</sub> in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH  
15 9, wird 100 µl einer 1 mol/l Lösung des Merkaptoethanolamins, pH 9, zugegeben und bei 40°C 3 h gerührt. Das Produkt der Reaktion,  
das dUTP-R-CO-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (Fig. 45), wird vom überschüssigen  
Merkaptoethanolamin auf DEAE-Cellulose im Borat-Puffer 10 mmol/l abgetrennt und mit 0,3 mol/l NaCl von der Säule eluiert.

20 Dieses Nukleotid hat eine unter milden Bedingungen spaltbare Thioester-Gruppe und kann an der Aminogruppe am Linker modifiziert werden.

An diese Amino-Gruppe können weitere Modifikationen vorgenommen werden.

25 Beispielsweise kann an sie ein Farbstoff gekoppelt werden:

Synthese von dUTP-R-CO-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-R-Cy3 (Fig. 46)

Zu 100 µl einer 10 mmol/l Lösung des dUTP-R-CO-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9, wurde Cy3-NHS bis zu Konzentration von 15 mmol/l zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei RT über 30 min. Anschließend wurde das mit Cy3-modifizierte  
30 Nukleotid auf Kieselgel-Platte und RP-18 Säule gereinigt, ähnlich wie in Beispiel 15 dargestellt.

Ein solches Nukleotid kann als reversibler Terminator in einem Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren eingesetzt werden (Tcherkassov WO 02088382). Die Spaltung der Thioester-Verbindung kann beispielsweise durch Zugabe von 100  
35 mmol/l Merkaptoethanol in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9, erfolgen.

An die Aminogruppe des dUTP-R-CO-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> kann auch ein langer Linker mit einem niedermolekularen Marker gekoppelt werden, ähnlich wie im Beispiel 19. Das

erhaltene dUTP-R-CO-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-PEG-Biotin kann als Zwischenprodukt für ein Nuk-Makromolekül dienen.

**Beispiel 38:**

5 dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3-PEG (Fig. 47),

Dieses Derivat kann aus dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3 (s. Beispiel 17) durch Modifikation der Aminogruppe im Linker mit einem mPEG-SPA, z.B. 5.000 Da, erhalten werden. Die Modifikationsbedingungen sind ähnlich wie im Beispiel 19. Dieses Molekül besitzt einen langen Linker und kann durch die erfindungsgemäße Methode zur  
10 schnellen Reinigung der modifizierten Nukleotide vor ihrem Einsatz in den Markierungsreaktionen eingesetzt werden. Für eine Trennung von markierten von unmarkierten Nukleotiden kann in diesem Beispiel ein Filter mit MWCO von 3000 verwendet werden.

15 **Beispiel 39:**

Synthese von dUTP-AA-SS-R-PEG-Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3 (Fig. 48)

Herstellung von SH-R-PEG-Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3 (Fig. 49):

Zu 200 µl einer 100 µmol/l Lösung von 3'-Amino-Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3 im 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9, wurde NHS-PEG-Maleimid zugegeben, bis die Konzentration von 20%  
20 (w/v) erreicht wurde. Das Gemisch wurde 2 h bei 40°C kräftig gerührt. Die Trennung des Maleimid-PEG-Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3 vom Überschuß an PEG-Derivat erfolgte auf DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie: Das Reaktionsgemisch wurde in 10 mmol/l Borat, pH 9, auf die Säule aufgetragen, und mit 20 Säulenvolumina 50 mmol/l Borat, pH 9, gewaschen. Elution von Maleimid-PEG-Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3 von der Säule erfolgte mit 1 M  
25 NaCl in 50 mmol/l Borat, pH 9. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration (MWCO 3000) zunächst eingengt und das Produkt wurde in 20 mmol/l Borat-Puffer, pH 9.0, umgepuffert. Das Maleimid-PEG-Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3 wurde vom Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3 auf präparativem 15% Polyacrylgel durch die Elektrophorese getrennt, aus dem Gel isoliert und in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9.0, aufgelöst. Ausbeute: 55%.

30 Zu Lösung mit Maleimid-PEG-Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3 wurde DTT bis zu Konzentration 0,5 mol/l zugegeben und das Gemisch wurde 16 h bei RT gerührt. Durch Reaktion von DTT mit Maleimid entsteht SH-R-PEG-Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3. Diese Substanz wurde auf DEAE-Säule vom DTT-Überschuß abgetrennt: Das Reaktionsgemisch wurde in 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0, auf die Säule aufgetragen, und mit 20 Säulenvolumina 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0 gewaschen. Elution von SH-R-PEG-Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3 von der Säule  
35 erfolgte mit 1 mol/l NaCl in 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0. Das Eluat wurde mit Ultrafiltration (MWCO 3000) zunächst eingengt und das Produkt, SH-R-PEG-Oligo-

dT<sub>31</sub>-Cy3, wurde in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9.0 umgepuffert. Die Konzentration von SH-R-PEG-Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3 betrug 100 µmol/l.

Zu dieser Lösung wurden 50 Äquivalente an dUTP-AA-PDTP (synthetisiert wie im Beispiel 1) zugegeben. Nach 3 h bei RT erfolgte Trennung auf DEAE-Cellulose: Das Gemisch wurde in 50 mmol/l Na-Acetat-Puffer, pH 6.0, auf die Säule aufgetragen, und mit 20 Säulenvolumina 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0, gewaschen. Elution von dUTP-AA-PDTP erfolgte mit 0,3 mol/l NaCl in 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0, Elution von dUTP-AA-SS-R-PEG-Oligo-dT<sub>31</sub>-Cy3 erfolgte mit 0,8 mol/l NaCl in 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0. Das Eluat wurde mit Ultrafiltration (MWCO 3000) zunächst eingeeengt und das Produkt wurde in 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0, umgepuffert.

Die Substanz trägt eine Nukleosid-Triphosphat-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten (Oligo-dT<sub>31</sub>). Das Oligo-dT<sub>31</sub> besteht aus Nukleosid-Monophosphaten, die allerdings an der enzymatischen Reaktion nicht teilnehmen und nur eine signalvermittelnde Funktion haben. An ein solches Oligonukleotid können komplementäre Nukleinsäuren hybridisiert werden, die eine signalgebende Funktion haben (Fig. 37B). (allgemeine Regeln zur Hybridisierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt, Anderson "Nucleic Acid Hybridization", 1999.).

Das Nukleotid ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

In ähnlicher Weise können auch andere Oligonukleotide an das dUTP-Derivat gekoppelt werden. In einer Ausführungsform der Erfindung können andere Homopolymer-Oligonukleotide, wie z.B. Poly-dC, poly-dG oder poly-dU oder poly-dA. In einer anderen Ausführungsform können auch Oligonukleotide mit spezifischen Sequenzen eingesetzt werden. Durch die spezifische Sequenzen von Oligonukleotiden können Nukleinsäureketten sequenzspezifisch hybridisiert werden. Zur Synthese von Nuk-Makromolekülen können auch Oligonukleotide eingesetzt werden, die Haarnadel-Strukturen (Stemloops) beinhalten.

In diesem Beispiel trägt das Oligonukleotid eine am 3'-Ende über einen Linker gekoppelte Amino-Gruppe, die als Kopplungsstelle für Maleimid-PEG-NHS auftritt, und

den Cy3-Fluoreszenzfarbstoff. Auch andere Kopplungsgruppen, wie SH-, Carboxy -, Aldehyd-Gruppen können eingesetzt werden.

Die Position der Kopplungsgruppe kann an einem der Enden der Oligonukleotide sein, oder auch mitten in der Sequenz liegen. Solche Oligonukleotide können von der Firma  
5 MWG-Biotech, Deutschland, synthetisiert werden.

Als Modifikationen können Oligonukleotide Fluoreszenzfarbstoffe oder andere Reporter-Gruppen, wie Biotin, Digoxigenin tragen. Auch mehrere Modifikationen pro ein Oligonukleotid sind möglich. Beispielsweise können FRET-Paare oder Fluoreszenzfarbstoff-Quanchermolekül-Paar in ein Oligonukleotid eingefügt werden.

10 Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-dCTP, 5-Amino-Propargyl-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es  
15 können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14. Auch andere basenmodifizierte Nukleotide können in ähnlicher Weise eingesetzt werden.

Durch Zugabe von Poly-dA oder Poly-A können mehrere dUTP-AA-SS-R-PEG-Oligo-  
20 dT31-Cy3, z.B. 10-20, zu einem Nuk-Makromolekül gekoppelt werden. Dabei entsteht ein Nuk-Makromolekül mit linear angeordneten Nuk-Linker-Komponenten (Fig. 37 C). Durch Zugabe von anderen modifizierten Oligonukleotiden, die an Poly-dA oder Poly-A binden können, können auch weitere Modifikationen eingeführt werden, z.B. Fluoreszenzmarkierung.

#### 25 **Beispiel 40:**

Synthese von  $(\text{dATP-PA-PEG})_n\text{-PAS-(Cy3)}_m$

Die Herstellung von dATP-PA-PEG-NH<sub>2</sub> wurde im Beispiel 19 beschrieben.

EDA-Cy3 wurde wie folgt synthetisiert: Zu 1ml wässriger EDA-Lösung, 400 mmol/l, pH  
30 8.5 eingestellt mit HCl, wurden 0,1 mg Cy3-NHS zugegeben. Die Reaktion wurde 30 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde auf RP-18 getrennt (Wasser-Methanol-Gradient) und auf 0.2 ml eingengt.

PAS 100 kDa (35% wässrige Lösung) wurde durch mehrmaliges Einrotieren mit DMF in  
35 eine wasserfreie DMF-Lösung überführt. Anschließend wurde zu 200 µl einer 0,1 mmol/l PAS (2 mg in 200 µl) in DMF 3 mg CDI zugegeben. Reaktion erfolgte und 30 min bei RT. Anschließend wurden zu dieser Lösung gleichzeitig 0,2 ml 0,7 mmol/l Lösung EDA-Cy3 und 0,2 ml 0,5 mmol/l dATP-PA-PEG-NH<sub>2</sub> zugegeben. Die Reaktion

wurde 1 Std. bei RT durchgeführt. Anschließend wurde Produkt  $(\text{dATP-PA-PEG})_n\text{-PAS-(Cy3)}_m$  durch Ultrafiltration mit 100 kDa MWCO von EDA-Cy3 und  $\text{dATP-PA-PEG-NH}_2$  getrennt.

Die durchschnittliche Zahl der Cy3-derivaten beträgt 5 pro ein PAS-Molekül, die durchschnittliche Zahl der Nuk-Einheiten (dATP) pro ein PAS-Molekül beträgt 2. Auf diese Weise wurde ein Nuk-Makromolekül synthetisiert, das mehrere Makrer-Einheiten und mehrere Nuk-Einheiten einschließt.

$(\text{dATP-PA-PEG})_n\text{-PAS-(Cy3)}_m$  dient als Substrat für die DNA-Polymerasen und kann in den Markierungsreaktionen eingesetzt werden.

#### **Beispiel 41:**

Nuk-Makromoleküle als Monomer-Bestandteile eines Oligonukleotides

Beispiele der enzymatischen Einbaus von Nuk-Makromolekülen in die Nukleinsäure s.

Beispiel 34 und 35.

Oben wurden Kopplungen eines langen Linkers und eines Markers an Nukleotid-Monomere beschrieben, die eine reaktive Gruppe tragen. In analoger Weise kann auch ein Nukleotid-Monomer, das als Teil eines Polymeres auftritt, z.B. einer Nukleinsäurekette, und eine reaktive Gruppe trägt, ebenfalls modifiziert werden.

Bevorzugt wurde bei der Modifizierung ein langer, linearer, nicht verzweigter Linker, wie PEG. Nukleotid-Monomere mit einer reaktiven Gruppe, beispielsweise einer Amino- oder Merkapto-Gruppe, können mit den Mitteln der konventionellen Oligonukleotid-Synthese in eine Nukleinsäurekette gekoppelt werden. Viele Modifikationen können bei einer Auftragssynthese, beispielsweise durch MWG-Biotech, in ein Oligonukleotid eingeführt werden.

Synthese eines modifizierten Oligonukleotids:

Ein Oligonukleotid mit 31 dT-Monomeren und einer am 5'-Ende gekoppelten Amino-Gruppe wurde von der MWG-Biotech synthetisiert (5'-Amino-dT31). An ein solches Oligonukleotid kann beispielsweise ein Fmoc-PEG-NHS Linker gekoppelt werden:

30

Zu 100  $\mu\text{l}$  wässriger Lösung 5'-Amino-dT31, 0,5 mmol/l, pH 8.0, wurden 1mg Fmoc-PEG-NHS (Fmoc-geschützter  $\text{NH}_2\text{-PEG-NHS}$ ) gegeben und bei 30°C 8 Stunden gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 11 erhöht und die Reaktionsmischung weitere 2 Stdunden bei RT gerührt. Anschließend wurde das modifizierte Oligonukleotid durch Elektrophorese in einem 15% Polyacrylgel vom nicht modifizierten getrennt und isoliert. Das Produkt der Reaktion ist  $\text{NH}_2\text{-PEG-dT31}$  wurde in 50  $\mu\text{l}$  50 mmol Hydrogencarbonat-Puffer, pH 8,0, aufgelöst (Konzentration 0,3 mmol/l). An die endständige Aminogruppe kann ein makromolekularer Marker gekoppelt werden.

35



Durch eine ähnliche Reaktion wie im Beispiel 40 kann ein mit einem makromolekularen Marker modifiziertes Oligonukleotid synthetisiert werden: EDA-Cy3 wurde wie im Beispiel 40 synthetisiert. PAS 100 kDa (35% wässrige Lösung) wurde durch mehrmaliges Einrotieren mit DMF in eine wasserfreie DMF-Lösung überführt. Anschließend wurde zu 50 µl einer 0,1 mmol/l PAS in DMF 1 mg CDI (als konzentrierte Lösung in DMF) zugegeben. Reaktion erfolgte und 30 min bei RT. Anschließend wurden zu dieser Lösung gleichzeitig 50 µl 1,5 mmol/l Lösung EDA-Cy3 und 50 µl 0,3 mmol/l NH<sub>2</sub>-PEG-dT31 zugegeben. Die Reaktion wurde 1 Std. bei RT durchgeführt. Anschließend wurde Produkt (dT31-PEG)<sub>n</sub>-PAS-(Cy3)<sub>m</sub> durch Ultrafiltration mit 100 kDa MWCO von EDA-Cy3 und NH<sub>2</sub>-PEG-dT31 getrennt. Die durchschnittliche Zahl der Cy3-derivaten beträgt 7 pro ein PAS-Molekül, die durchschnittliche Zahl der gekoppelten Oligonukleotide pro ein PAS-Molekül beträgt 1. Auf diese Weise wurde ein mit einem polymer modifiziertes Oligonukleotid synthetisiert, das ein Nuk-Makromolekül einschließt.

#### **Beispiel 42**

Synthese eines Nuk-Makromoleküls mit einem Linker am Phosphat.

Ein Linker kann auch an Phosphat-Gruppen eines Nukleotid gekoppelt werden. Eine Kopplung einer reaktiven Gruppe, beispielsweise einer Amino-Gruppe an die endständige Phosphat-Gruppe ist bereits bekannt (Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, v. 278, S. 363-, A. Draganescu et al. J. Biol.Chem. 2000 v.275, 4555-). Analog zu Synthesen in anderen Beispielen kann die Linker-Komponente an das Nukleotid gekoppelt werden.

#### **Beispiel 43**

Herstellung eines modifizierten Klenow-Fragments Exo minus der DNA-Polymerase I der E. coli (im weiteren Bezeichnet als Klenow-Fragments Exo minus).

In einer Ausführungsform der Modifikation werden zu 70 µl einer Puffer-Lösung mit Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase (750 Units-Vial von Amersham Bioscience, aufgelöst im Hersteller-Puffer: 50 mmol/l Kalium-Phosphat-Puffer, pH7, 1,0 mmol/l DTT, 50% Glycerol) 100 µl einer Puffer-Lösung (200 mmol/l Tris-HCl-Puffer, pH 10.0, 60% Glycerin) zugegeben, der pH-Wert der Lösung mit Polymerase beträgt nun 9.0. Anschließend werden 30 µl einer 1 mol/l wässrigen Iod-Acetamid-Lösung zugegeben. Die Reaktion wird 30 min bei RT durchgeführt. Auf diese Weise erfolgt eine selektive Modifizierung der Polymerase an der SH-Gruppe des Cysteins.

In einer anderen Ausführungsform der Modifikation erfolgt zunächst eine Zugabe von 10 µl 50 mmol/l TCEP-NaOH-Lösung, pH 8, zu 70 µl einer Puffer-Lösung mit Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase (750 Units-Vial von Amersham Bioscience aufgelöst im Hersteller-Puffer, s.o.). Nach 10 min bei RT erfolgt dann die Zugabe von 100 µl einer Puffer-Lösung (200 mmol/l Tris-HCl-Puffer, pH 10.0, 60% Glycerin) zur Lösung mit Polymerase. Anschließend werden 30 µl einer 1 mol/l wässrigen Iod-Acetamid-Lösung zugegeben. Die Reaktion erfolgt 30 min bei RT. Auf diese erfolgt eine selektive Modifizierung der Polymerase an der SH-Gruppe.

- 10 Die Reinigung der modifizierten Polymerase kann beispielsweise über Ultrafiltration oder über Ionenaustauscher oder Dialyse erfolgen.

Die Aufbewahrung der modifizierten Polymerase erfolgt beispielsweise in einem glycerinhaltigen Puffer. Als Puffer eignen sich beispielsweise Tris-HCl, Borat, Phosphat-Puffer. Der pH-Wert dieser Puffer liegt beispielsweise zwischen 5 und 10. Die Konzentration des Glycerins kann beispielsweise zwischen 10 und 70% liegen. Auch andere Reagenzien, wie beispielsweise PEG oder Salze wie NaCl, NH<sub>4</sub>Cl können zur Polymerase-Lösung zugegeben werden. Vorzugsweise wird kein Reduzierungsmittel, wie beispielsweise DTT, zur Lösung mit Polymerase zugegeben.

- 20 In einer Ausführungsform enthält der Aufbewahrungspuffer zusätzlich ein Reagenz, das mit SH-Gruppen selektiv reagieren kann, beispielsweise IodAcetamid in Konzentration zwischen 1 mmol/l und 500 mmol/l.

Eine auf diese Weise modifizierte Polymerase kann anstelle von Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase in Reaktionen mit Nuk-Makromolekülen eingesetzt werden.

# Makromolekulare Nukleotidverbindungen und Methoden zu deren Anwendung

## Patentansprüche:

### 1. Makromolekulare Verbindungen mit der Struktur:

(Nuk-Linker)<sub>n</sub>-Marker

wobei:

Nuk - ein Nukleotid oder ein Nukleosid ist (Nuk-Komponente)

Linker - eine Linker-Komponente, die folgende Bestandteile einschließt:

a) Kopplungseinheit L - ein Teil des Linkers, das die Verbindung zwischen Nuk und dem Linkerrest darstellt

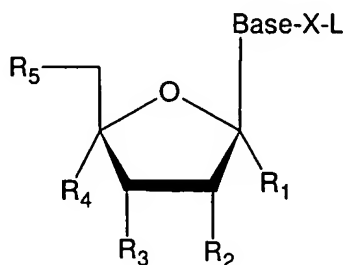
b) ein Polymer- ein Teil des Linkers, das ein wasserlösliches Polymer mit einer durchschnittlichen Länge zwischen 100 und 20.000 Atome (Kettenatome) ist

c) Kopplungseinheit T - ein Teil des Linkers, das die Verbindung zwischen dem Linkerrest und dem Marker darstellt

Marker - eine Marker-Komponente ist

n - eine ganze Zahl zwischen 1 und 100 ist

### 2. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt:



Wobei:

Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren Modifikationen, wobei X die Kopplungsstelle des Linkers an der Base ist und L - die Kopplungseinheit des Linkers (L).

R<sub>1</sub> - ist H

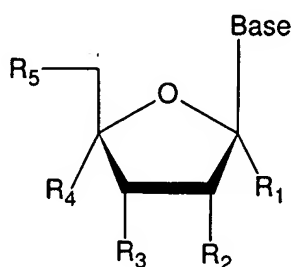
R<sub>2</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen, NH<sub>2</sub>, SH oder geschützte OH-Gruppe

$R_3$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen,  $PO_3$ , SH,  $N_3$ ,  $NH_2$ ,  $O-CH_3$ ,  $O-CH_2-O-CH_3$ ,  $O-CH_2-CH=CH_2$ ,  $O-R_{3-1}$ ,  $P(O)_m-R_{3-1}$  ( $m$  ist gleich 1 oder 2),  $NH-R_{3-1}$ ,  $S-R_{3-1}$ ,  $Si-R_{3-1}$  wobei  $R_{3-1}$  eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist.

5  $R_4$  - ist H oder OH

$R_5$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, oder eine Monophosphat-Gruppe, oder eine Diphosphat-Gruppe, oder eine Triphosphat-Gruppe, oder eine Alpha-Thiotriphosphat-Gruppe ist.

10 3. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt:



Wobei:

15 Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

$R_1$  - ist H

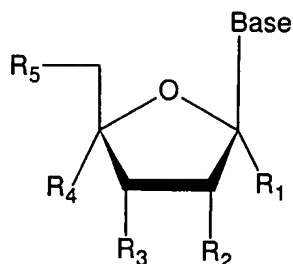
20  $R_2$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen,  $NH_2$ , SH oder geschützte OH-Gruppe

$R_3$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe  $O-R_{3-2}-L$ ,  $P(O)_m-R_{3-2}-L$ , wobei  $m$  1 oder 2 ist,  $NH-R_{3-2}-L$ ,  $S-R_{3-2}-L$ ,  $Si-R_{3-2}-L$  oder, wobei  $R_{3-2}$  die Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid ist und  $L$  - die Kopplungseinheit des Linkers ( $L$ ) ist.

25  $R_4$  - ist H oder OH

30  $R_5$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, oder eine Monophosphat-Gruppe, oder eine Diphosphat-Gruppe, oder eine Triphosphat-Gruppe, oder eine Alpha-Thiotriphosphat-Gruppe ist.

4. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt:



Wobei:

5 Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

R<sub>1</sub> - ist H

10 R<sub>2</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, NH<sub>2</sub>, SH oder geschützte OH-Gruppe

R<sub>3</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, PO<sub>3</sub>, SH, NH<sub>2</sub>, O- R<sub>3-1</sub>, P(O)<sub>m</sub>- R<sub>3-1</sub> (m ist gleich 1 oder 2), NH-R<sub>3-1</sub>, S-R<sub>3-1</sub>, Si-R<sub>3-1</sub> wobei R<sub>3-1</sub> eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist.

15

R<sub>4</sub> - ist H oder OH

R<sub>5</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe O- R<sub>5-1</sub>-L, oder P-(O)<sub>3</sub>- R<sub>5-1</sub>-L (modifizierte Monophosphat-Gruppe), oder P-(O)<sub>3</sub>-P-(O)<sub>3</sub>-R<sub>5-1</sub>-L (modifizierte Diphosphat-Gruppe) oder P-(O)<sub>3</sub>-P-(O)<sub>3</sub>-P-(O)<sub>3</sub>- R<sub>5-1</sub>-L (modifizierte Triphosphat-Gruppe), wobei R<sub>5-1</sub> die Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid ist und L - die Kopplungseinheit des Linkers (L) ist.

20

25 5. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 4, wobei die Kopplungseinheit des Linkers (L) folgende strukturelle Elemente einschließt:

R<sub>6</sub>-NH-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-O-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-S-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-SS-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-NH-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-NH-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-O-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-O-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-S-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-S-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-P(O)<sub>2</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-Si-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>,

R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-B-R<sub>7</sub>,

30

R<sub>6</sub>-(CH=CH)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(A-CH=CH)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH=CH-B)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>,

R<sub>6</sub>-A-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(-CH=CH-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-B-R<sub>7</sub>,

R<sub>6</sub>-(C≡C)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(A-C≡C)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(C≡C-B)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>,

$R_6-A-C\equiv C-(CH_2)_n-R_7$ ,  $R_6-(-C\equiv C-CH_2)_n-B-R_7$ ,  $R_6-(-C\equiv C-CH_2-CH_2)_n-B-R_7$ ,

wobei  $R_6$  - die Nuk-Komponente ist,  $R_7$  - der Linkerrest ist und A und B folgende strukturelle Elemente einschließen: -NH-, -O-, -S-, -SS-, -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -P(O)<sub>2</sub>-, -Si-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, eine photolabile Gruppe, wobei n - gleich 1 bis 5 ist

6. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 5, wobei die Linker-Komponente ein wasserlösliches Polymer einschließt.

10

7. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 6, wobei die Linker-Komponente wasserlösliche Polymere unabhängig ausgewählt aus folgender Gruppe einschließt:

15

Polyethylen-glycol (PEG), Polysaccharide, Dextran, Polyamide, Polypeptide, Polyphosphate, Polyacetate, Poly(alkyleneglycole), Kopolymere aus Ethylenglycol und Propylenglycol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(x-Hydroxy-Säuren), Poly-Acrylsäure, Poly-Acrylamid, Poly(Vinylalkohol).

20

8. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 7, wobei ein Linker-Komponente eine durchschnittliche Länge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10000, 10000 und 50000 Atome (Kettenatome) hat.

25

9. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 8, wobei eine Marker-Komponente eine signalgebende, signalvermittelnde, katalytische oder affine Funktion hat

30

10. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente aus einer strukturellen Marker-Einheit besteht

35

11. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente aus mehreren strukturellen Marker-Einheiten gebunden an eine Kern-Komponente besteht

12. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 10 oder 11, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden strukturellen Elemente einschließt:  
Biotin, Hapten, radioaktives Isotop, seltene Erdenatom, Farbstoff, Fluoreszenzfarbstoff.
13. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 10 oder 11 , wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt:  
Nanokristalle oder deren Modifikationen, Proteine oder deren Modifikationen, Nukleinsäureketten oder deren Modifikationen, Teilchen oder deren Modifikationen.
14. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eines der folgenden Proteine einschließt:  
Enzyme oder deren Konjugate oder Modifikationen,  
Antikörper oder deren Konjugate oder Modifikationen,  
Streptavidin oder seine Konjugate oder Modifikationen,  
Avidin oder seine Konjugate oder Modifikationen
15. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eine der folgenden Arten Nukleinsäureketten einschließt: DNA, RNA, PNA, wobei die Länge von Nukleinsäureketten zwischen 10 und 10.000 Nukleotide liegt
16. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 11 bis 15, wobei die Kernkomponente der Marker-Komponente unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt: wasserlöslichen Polymer aus der Gruppe von: Polyamide (z.B. Polypeptide), Poly-Acrylsäure und deren Derivate, Poly-Acrylamide und deren Derivate, Poly-Vinylalkohole und deren Derivate, Nukleinsäuren und deren Derivate, Streptavidin oder Avidin und deren Derivate, Dendrimere, wobei diese Elemente linear oder verzweigt oder unter einander vernetzt sein können
17. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 9, 11 bis 16, wobei die Verbindung zwischen mehreren strukturellen Marker-Einheiten und der Kernkomponente kovalent oder affine erfolgt.

18. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 10, wobei die Verbindung zwischen einer strukturellen Marker-Einheit und dem Linker kovalent oder affine erfolgt
- 5 19. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 9, 11 bis 17, wobei die Verbindung zwischen der Kern-Komponente und dem Linker kovalent oder affine erfolgt
- 10 20. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt.
- 15 21. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 20, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und die Linker-Komponente eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.
- 20 22. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 21, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt
- 25 und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, dass nur eine Nuk-Komponente in einen wachsenden Strang eingebaut werden kann.
- 30 23. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19 wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt sind, wobei die Länge der jeweiligen Linker-Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt.



24. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19, 23, wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker- Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und der jeweilige Linker eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

25. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19, 23, 24, wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker- Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, dass nur eine Nuk-Komponente in eine wachsende Nukleinsäurekette eingebaut werden kann.

26. Oligonucleotide oder Polynucleotide die mindestens ein Nuk-Makromolekül nach Ansprüchen 1 bis 25 pro eine Nukleinsäurekette einschließen.

27. Oligonucleotide oder Polynucleotide nach Anspruch 26, wobei Oligo- oder Polynucleotide RNA, DNA oder PNA sind, deren Länge zwischen 5 und 50.000 Nukleotide beträgt.

28. Verfahren zur Modifizierung von Nukleinsäureketten, wobei für die Kopplung Nuk-Makromoleküle nach Ansprüchen 1 bis 25 verwendet werden

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Ansprüchen 1 bis 25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt
- mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,
- mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten,

30. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Ansprüchen 1-25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt
  - mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,
  - mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten
  - mindestens eine weitere Art von Nukleosidtriphosphaten
31. Verfahren nach Ansprüchen 29, 30, wobei die Enzymart unabhängig eine der folgenden Gruppen einschließt: DNA-Polymerase, RNA-Polymerase, Terminale Transferase,
32. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: Ribo-Nukleosidtriphosphaten (ATP, GTP, UTP, CTP), von 2'-Deoxyribonukleosid-Triphosphaten (dATP, dUTP, dTTP, dCTP, dGTP), von 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddATP, ddGTP, ddUTP, ddCTP, ddTTP).
33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten konventionell modifizierte Nukleotide mit einer Markierung sind, wobei diese Markierung unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Biotin, ein Hapten, ein radioaktives Element.
34. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 33, wobei mindestens zwei unterschiedliche Populationen an Nukleinsäureketten präsent sind
35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei mindestens eine der Populationen der Nukleinsäureketten eine Primer-Funktion hat und mindestens eine Population der Nukleinsäureketten eine Matrizen-Funktion.
36. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Modifizierung durch eine chemische Kopplung erfolgt, wobei die Kopplung der Nuk-Makromoleküle an Nukleinsäureketten durch Phosphoroamidit-Kopplung erfolgt.

37. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die die Kopplung nur einer einzigen Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäure-Strang zulassen und der mehrfache Einbau durch Modifikationen an der Nuk-Komponente, und/oder der Linker-Komponente und/oder der Marker-Komponente verhindert wird.
38. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die weitere Kopplung reversibel verhindert wird.
39. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die weitere Kopplung irreversibel verhindert wird.
40. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die eine Kopplung mehrerer Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäurestrang zulassen
41. Verfahren nach Ansprüchen 28-40, wobei die an der Reaktion teilnehmenden Nukleinsäureketten an eine feste Phase gekoppelt sind und adressierbare Positionen haben.
42. Verfahren nach Anspruch 41, wobei die Nukleinsäureketten eine einheitliche Population darstellen
43. Verfahren nach Anspruch 41, wobei die Nukleinsäureketten zwei oder mehrere unterschiedliche Populationen darstellen und jede der Populationen eine adressierbare Position auf der festen Phase hat
44. Verfahren nach Ansprüchen 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

45. Verfahren nach Ansprüchen 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der in den wachsenden Nukleinsäurestrang eingebauten Nuk-Komponente abgetrennt wird.

46. Verfahren nach Ansprüchen 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen jeweils unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

47. Verfahren nach Ansprüchen 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der Nuk-Komponente abgetrennt wird.

48. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen auf der festen Phase als Spots auf einer planen Oberfläche verteilt sind, wobei pro ein Spot Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

49. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen an den Kügelchen bzw. Partikel befestigt sind, wobei pro ein Kügelchen Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

50. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen in einem Multigefäßsystem, wie Mikrotiterplatte oder Nanotiterplatte oder Pikotiterplatte, verteilt sind, wobei in einem Gefäß des Multigefäßsystems die Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

--

51. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 35 und 37 bis 50, das folgende Schritte einschließt:

- 5           a) Bereitstellung mindestens einer Population an einzelsträngigen Nukleinsäureketten (NSK)
- b) Hybridisierung von Primern an diese Nukleinsäureketten, wobei extensionsfähige NSK-Primer-Komplexe entstehen
- 10          c) Inkubation von mindestens einer Art der Nuk-Makromoleküle nach Ansprüchen 1 bis 25 zusammen mit einer Art der Polymerase nach Anspruch 31 mit den in Schritten a und b bereitgestellten NSK-Primer-Komplexen unter Bedingungen, die den Einbau von komplementären Nuk-Makromolekülen zulassen, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt.
- 15          d) Entfernung der nicht eingebauten Nuk-Makromoleküle von den NSK-Primer-Komplexen
- e) Detektion der Signale von in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
- f) Entfernung der Linker-Komponente und der Marker-Komponente von den in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
- 20          g) Waschen der NSK-Primer-Komplexe
- gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (c) bis (g).

52. Verfahren nach Ansprüchen 28-40, wobei die Nukleinsäureketten an eine feste Phase in zufälliger Anordnung gekoppelt sind.

53. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 41, 52 zur parallelen Sequenzanalyse von Nukleinsäuresequenzen (Nukleinsäureketten, NSKs), bei dem man

30           Fragmente (NSKFs) einzelsträngiger NSKs mit einer Länge von etwa 50 bis 1000 Nukleotiden erzeugt, die überlappende Teilsequenzen einer Gesamtsequenz darstellen können, man

          die NSKFs unter Verwendung eines einheitlichen oder mehrerer unterschiedlichen Primer in Form von NSKF-Primer-Komplexen auf einer Reaktionsoberfläche in einer zufälligen Anordnung bindet, man

35

eine zyklische Aufbaureaktion des komplementären Stranges der NSKFs unter Verwendung einer oder mehrerer Polymerasen durchführt, indem man

5 a) zu den auf der Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine Lösung zugibt, die eine oder mehrere Polymerasen und ein bis vier Nuk-Makromoleküle enthält, die eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Marker-Komponente haben, wobei die bei gleichzeitiger Verwendung von mindestens zwei Nuk-Makromoleküle jeweils an die Marker-Komponente befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe so gewählt sind, dass sich die verwendeten Nuk-Makromoleküle durch Messung unterschiedlicher Fluoreszenzsignale  
10 voneinander unterscheiden lassen, wobei die Nuk-Makromoleküle strukturell so modifiziert sind, dass die Polymerase nach Einbau eines solchen Nuk-Makromoleküls in einen wachsenden komplementären Strang nicht in der Lage ist, ein weiteres Nuk-Makromolekül in denselben Strang einzubauen, wobei die Linker-Komponente mit der Marker-Komponente abspaltbar sind,  
15 man

b) die in Stufe a) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen inkubiert, die zur Verlängerung der komplementären Stränge geeignet sind, wobei die komplementären Stränge jeweils um ein Nuk-Makromolekül verlängert werden, man  
20

c) die in Stufe b) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung nicht in einen komplementären Strang eingebauter Nuk-Makromoleküle geeignet sind, man  
25

d) die einzelnen, in komplementäre Stränge eingebauten Nuk-Makromoleküle durch Messen des für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Signals detektiert, wobei man gleichzeitig die relative Position der einzelnen Fluoreszenzsignale auf der Reaktionsoberfläche bestimmt, man  
30

e) zur Erzeugung unmarkierter (NTs oder) NSKFs die Linker-Komponente und die Marker-Komponente von den am komplementären Strang angefügten Nuk-Komponenten abspaltet, man  
35

f) die in Stufe e) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung der Marker-Komponente geeignet sind, man

die Stufen a) bis f) gegebenenfalls mehrfach wiederholt,

5 wobei man die relative Position einzelner NSKF-Primer-Komplexe auf der Reaktionsoberfläche und die Sequenz dieser NSKFs durch spezifische Zuordnung der in Stufe d) in aufeinanderfolgenden Zyklen an den jeweiligen Positionen detektierten Fluoreszenzsignale zu den Nuk-Makromolekülen bestimmt.

10 54. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus nur jeweils eine Art der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

15 55. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

20 56. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils vier unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

25 57. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die NSKs Varianten einer bekannten Referenzsequenz sind und man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in den Zyklen abwechselnd jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle und zwei unmarkierte NTs einsetzt und man die Gesamtsequenzen durch Vergleich mit der Referenzsequenz ermittelt.

30 58. Verfahren nach den Ansprüchen 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man in die NSKFs jeweils eine Primerbindungsstelle (PBS) einführt, wobei man bei doppelsträngigen NSKs an beiden komplementären Einzelsträngen jeweils eine PBS einführt und wobei die Primerbindungsstellen für alle NSKFs jeweils gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.

35

59. Verfahren nach den Ansprüchen 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs mit Primern in einer Lösung unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen, und man die gebildeten NSKF-Primer-Komplexe anschließend auf der Reaktionsoberfläche bindet.
60. Verfahren nach den Ansprüchen 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs zunächst auf der Reaktionsoberfläche immobilisiert und erst anschließend mit Primern unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei NSKF-Primer-Komplexe gebildet werden, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.
61. Verfahren nach Ansprüchen 53 bis 60, bei dem an 10 bis 100.000 unterschiedlichen Sequenzpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt
62. Verfahren nach Ansprüchen 53 bis 60, bei dem an 100.000 bis 100.000.000 unterschiedlichen Sequenzpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt.
63. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 62, wobei die Sequenzen der Nukleinsäureketten ermittelt werden
64. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 63, wobei die Marker-Komponente fluoreszent markiert ist
65. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 64, wobei die feste Phase unabhängig aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Silicon, Glas, Keramik, Kunststoffe, Gele oder deren Modifikationen
66. Ein Kit, das die makromolekularen Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 25 einschließt.



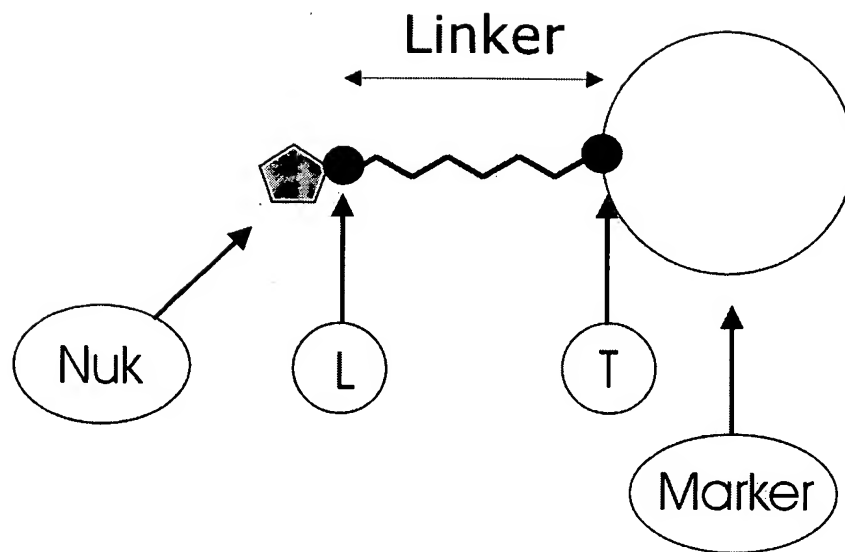
67. Verfahren, bei denen makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 1 bis 25 in enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden, wobei Enzyme folgende Gruppen einschließen: Polymerasen, Ligasen, Nukleasen (Endo oder Exonukleasen).

5

68. Verfahren, bei denen makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 26 und 27 in enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden, wobei Enzyme folgende Gruppen einschließen: Polymerasen, Ligasen, Nukleasen (Endo oder Exonukleasen).

10

Fig. 1



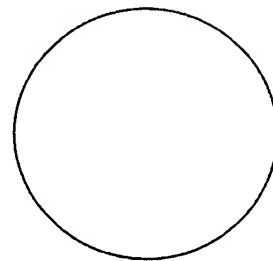
Legende:



Nuk-Komponente

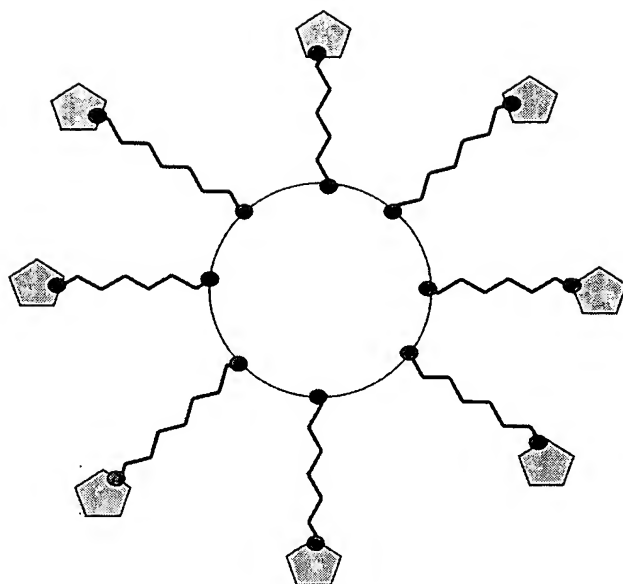


Linker-Komponente



Marker-Komponente

Fig. 2



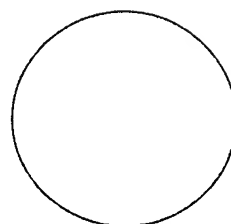
Legende:



Nuk-Komponente



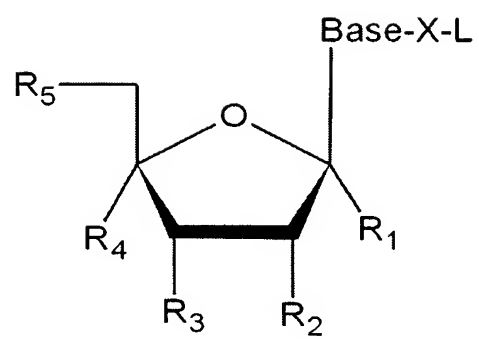
Linker-Komponente



Marker-Komponente

Fig. 3

A)



B)

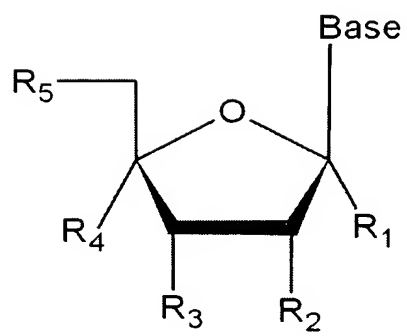
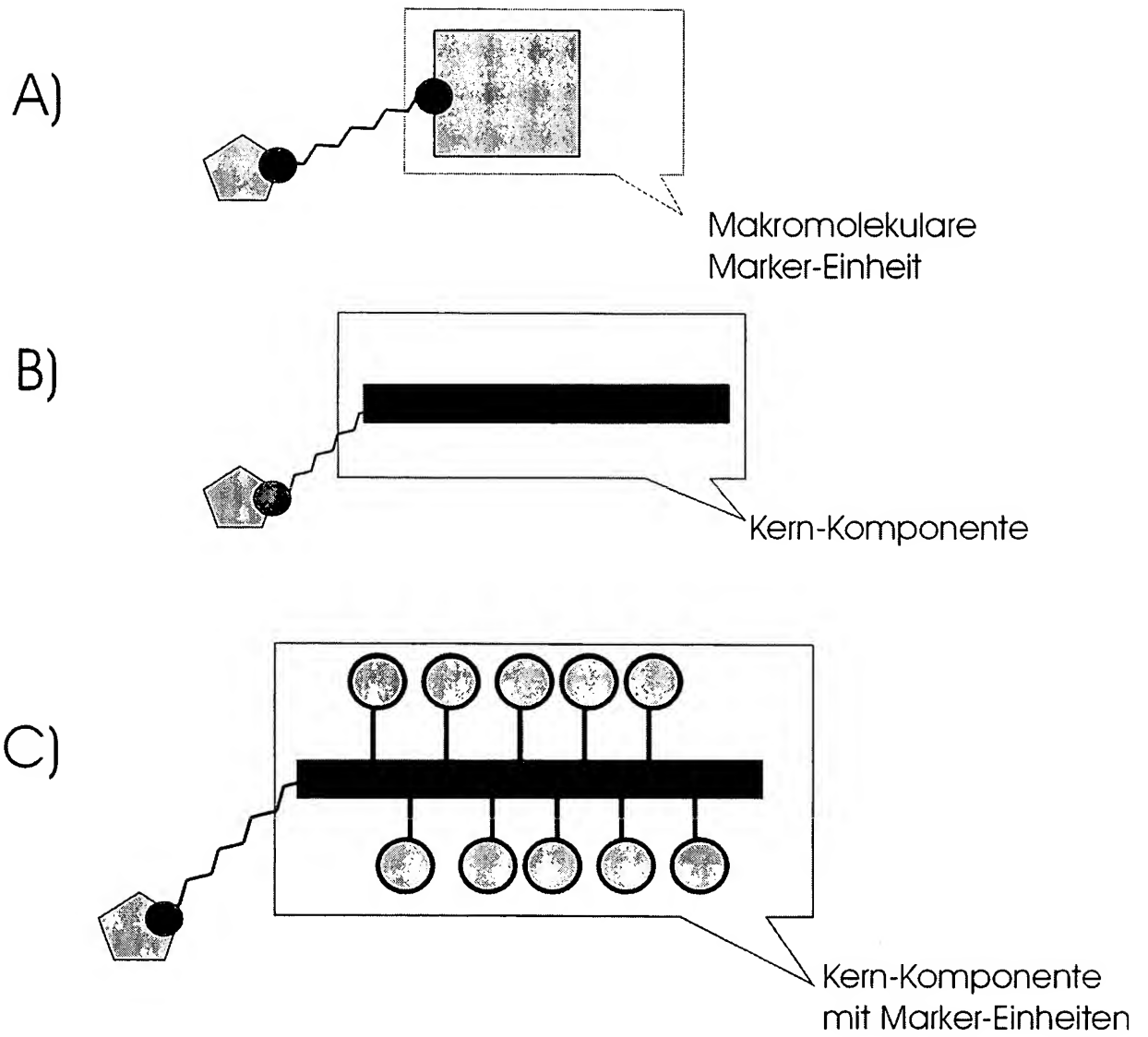


Fig. 4



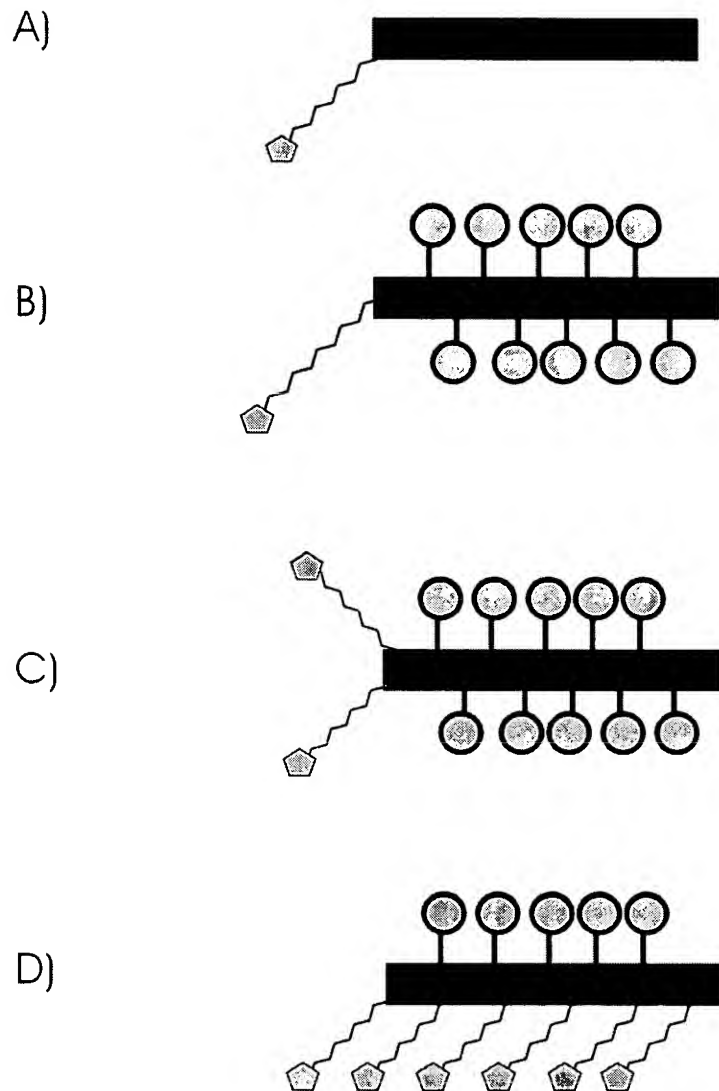
Legende:



Nuk-Komponente

Linker-Komponente

Fig. 5



Legende:



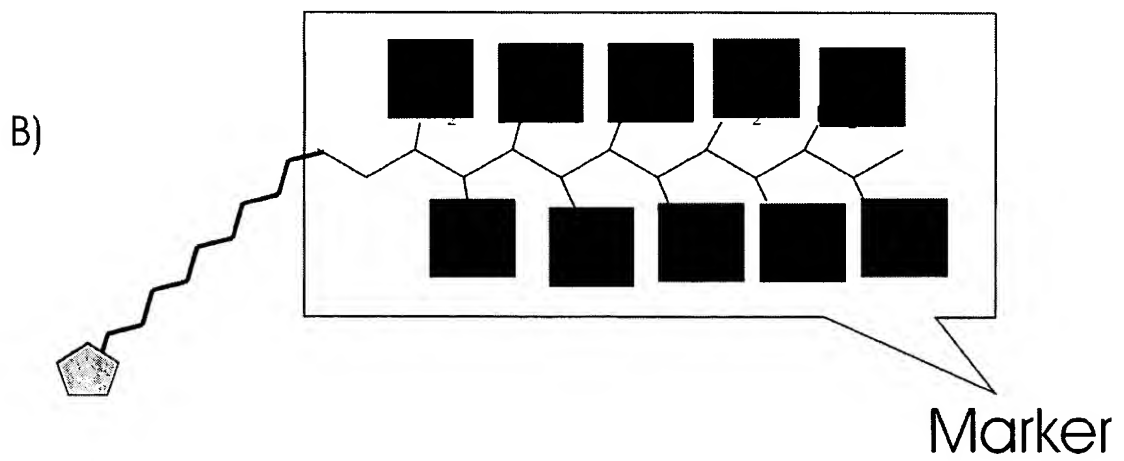
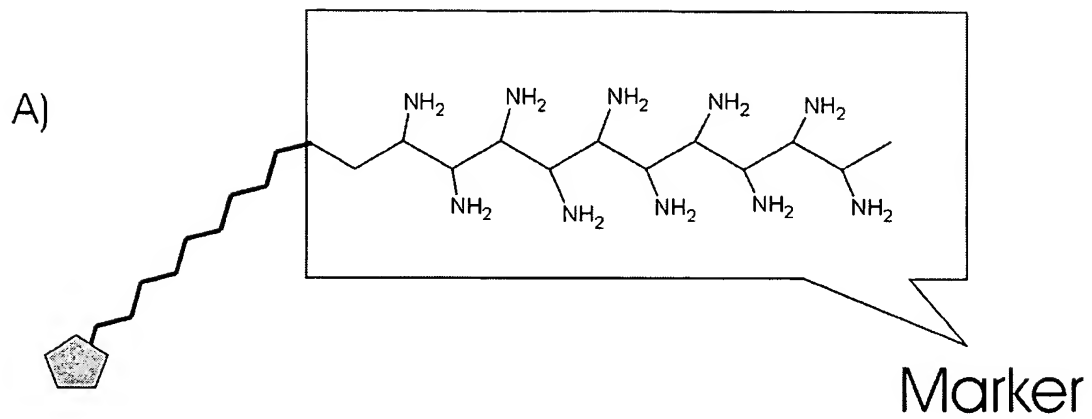
Nuk-Komponente

Linker-Komponente

Kern-Komponente

Marker-Einheit  
an einem Linker

Fig. 6



Legende:



Nuk-Komponente



Linker-Komponente



Signalgebende  
Marker-Einheit

Fig. 7

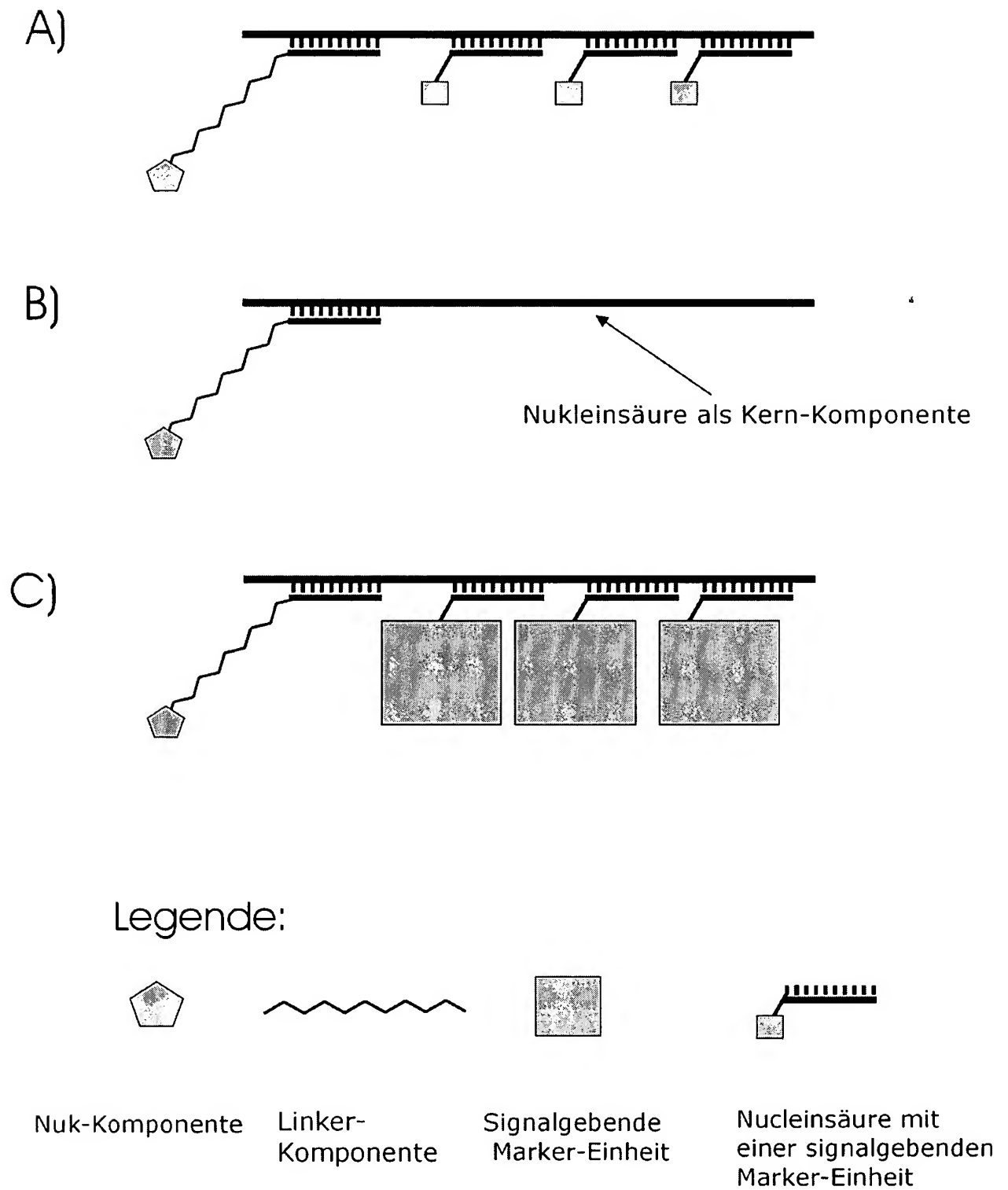
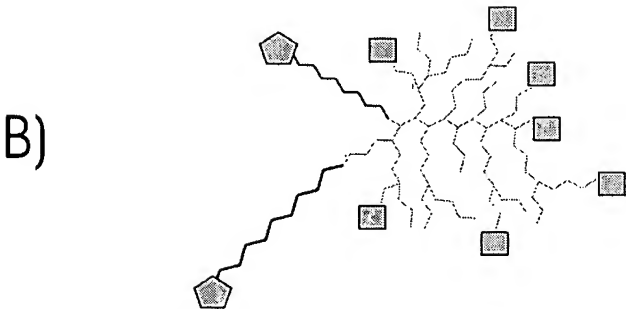
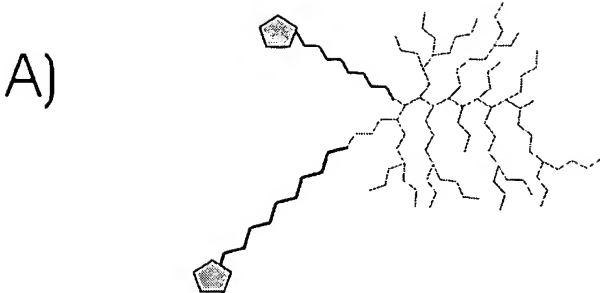




Fig. 8



Legende:



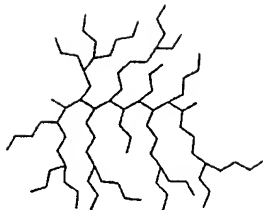
Nuk-Komponente



Linker-Komponente

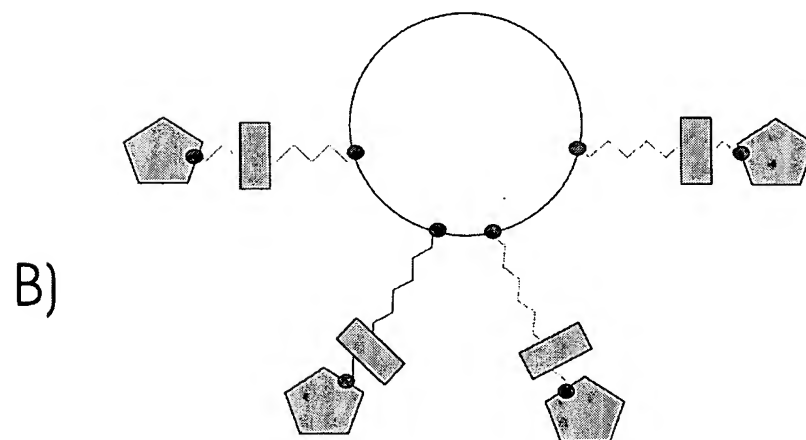
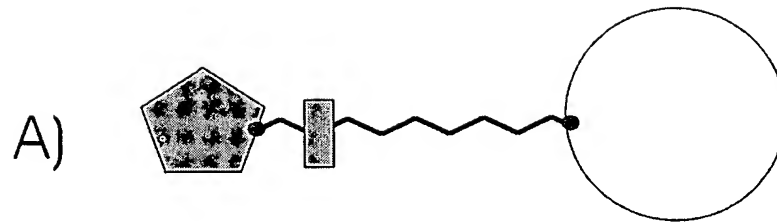


Signalgebende  
Marker-Einheit



Verzweigtes Polymer  
als Kern-Komponente,  
z.B. Dendrimer

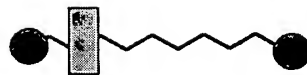
Fig. 9



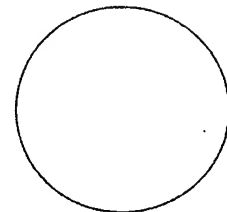
Legende:



Nuk-Komponente



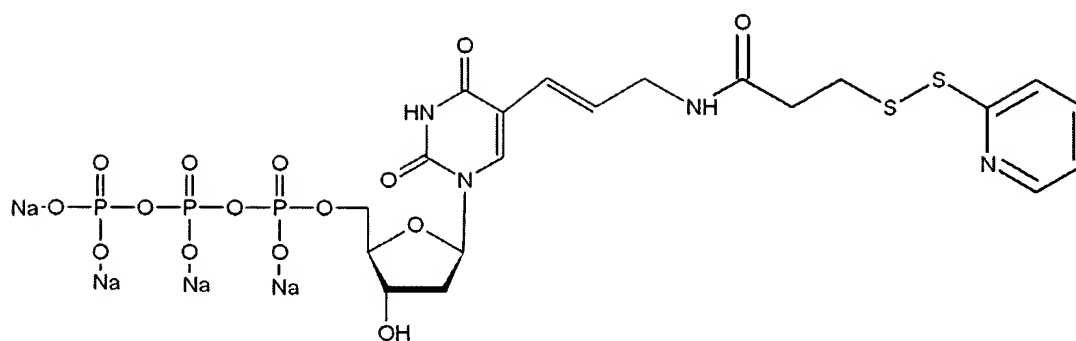
Linker-Komponente  
mit einer  
spaltbaren Verbindung



Marker-Komponente

Fig. 10

A)



B)

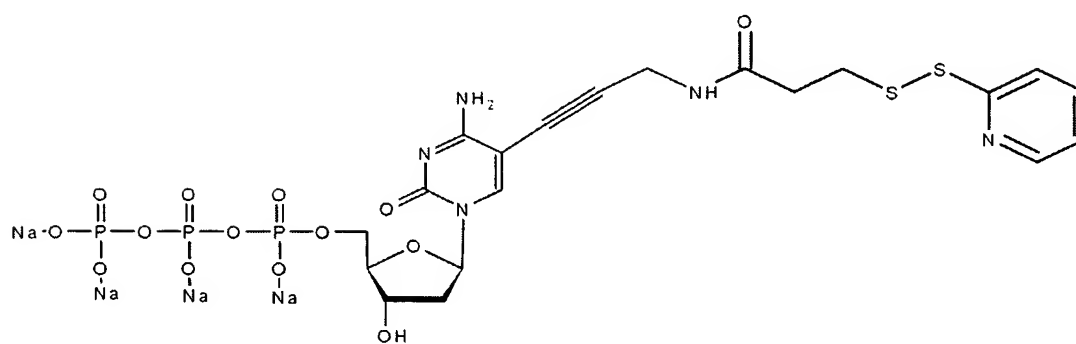


Fig. 11

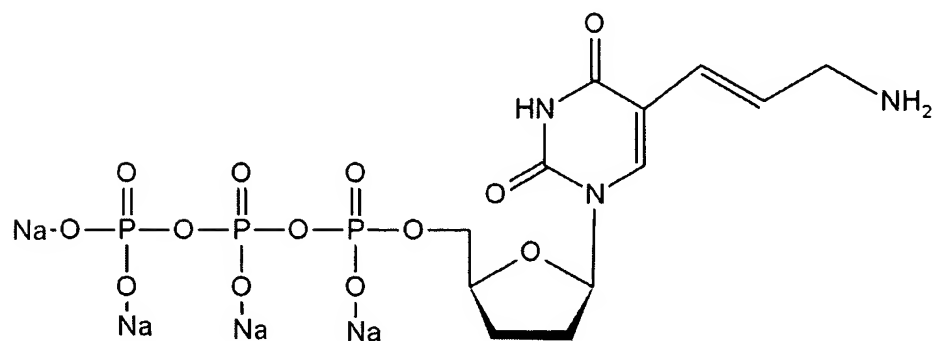
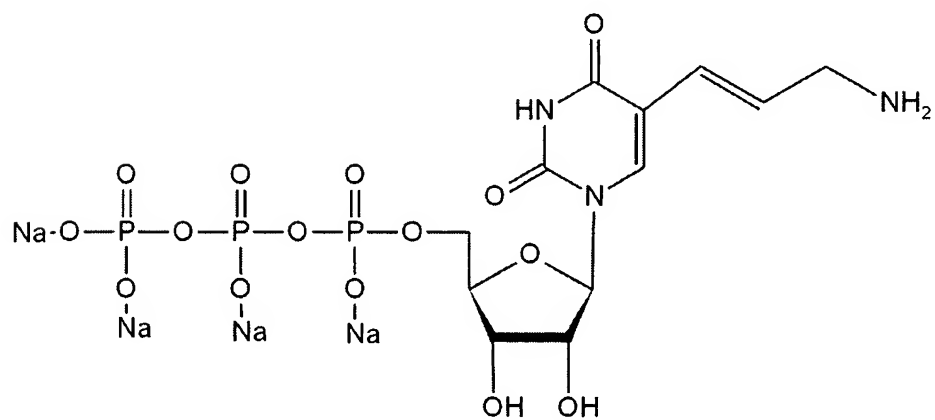
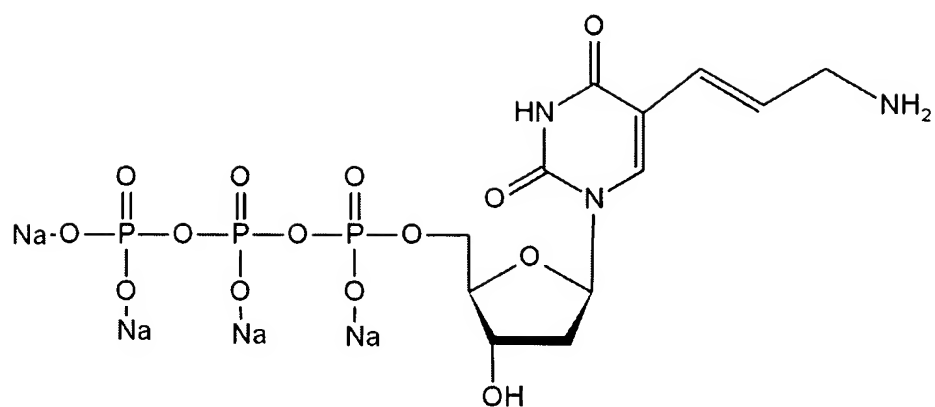


Fig. 12

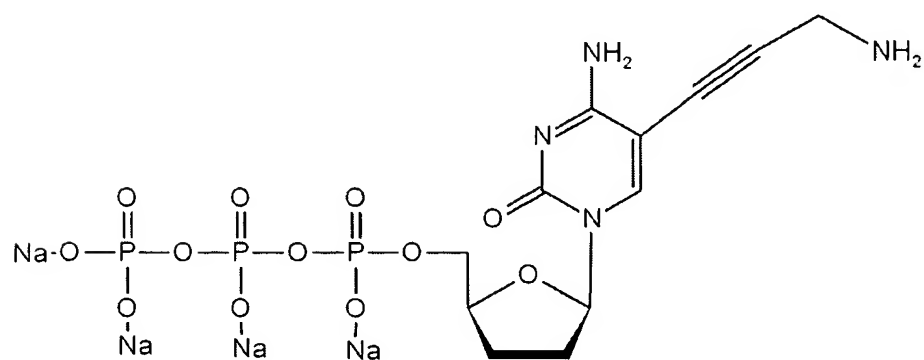
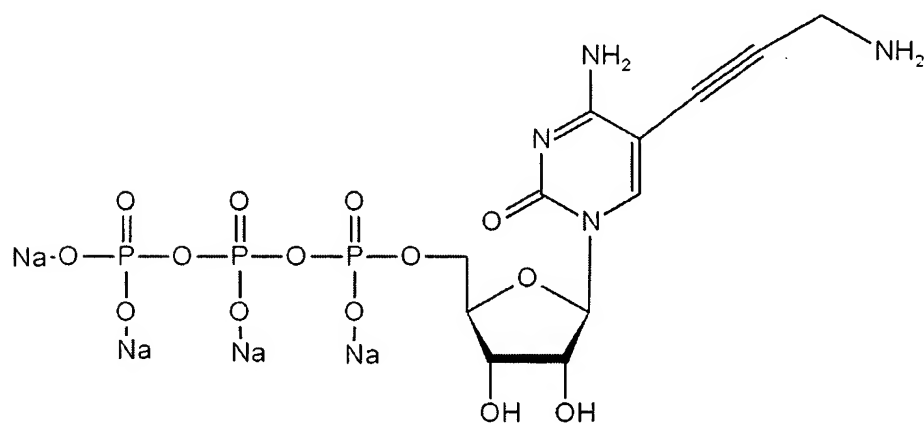
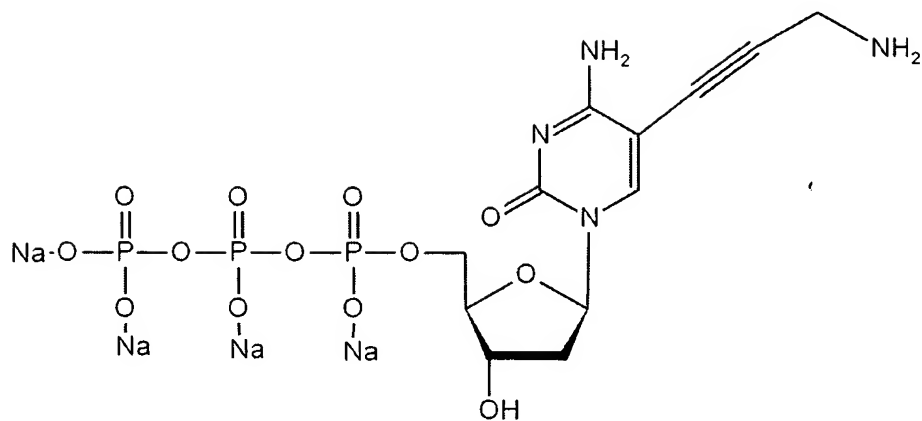


Fig. 13

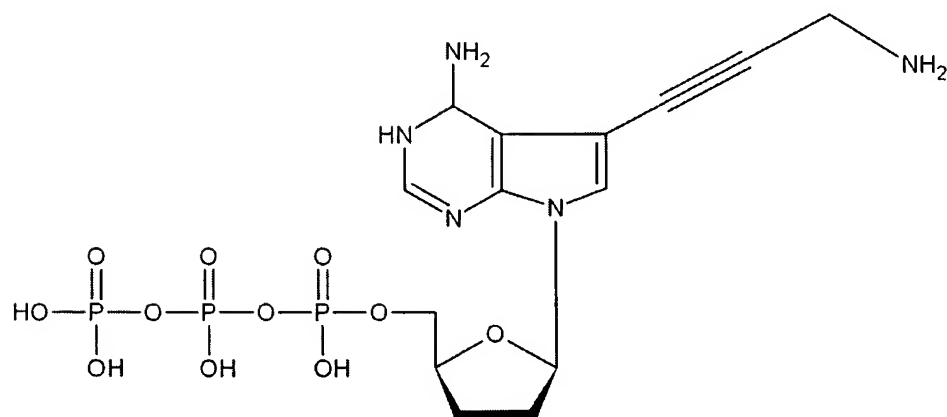
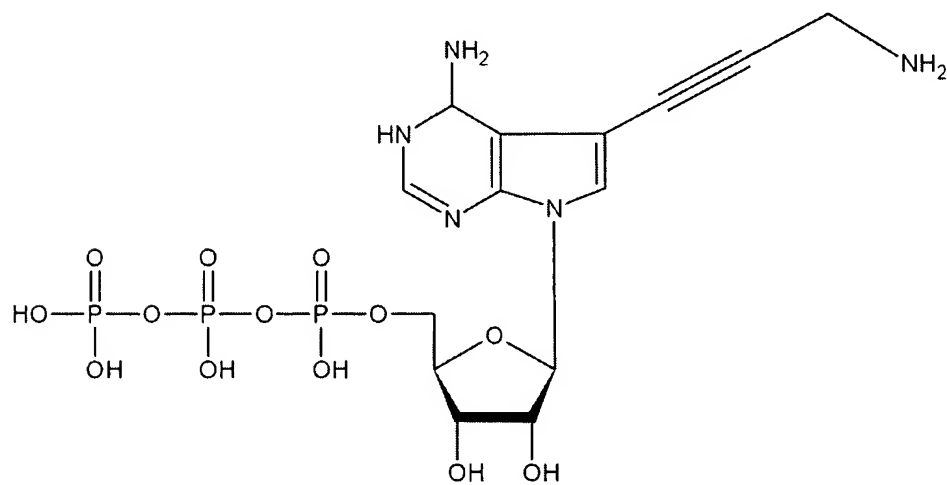
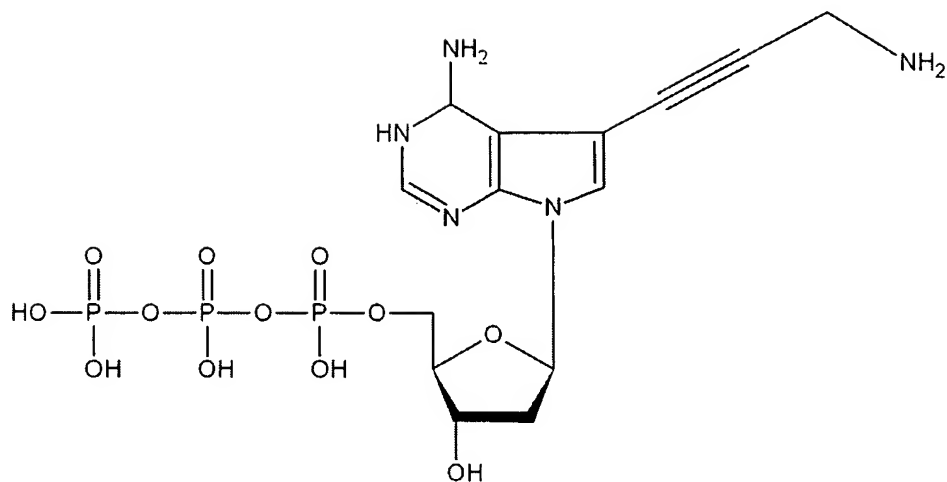


Fig. 14

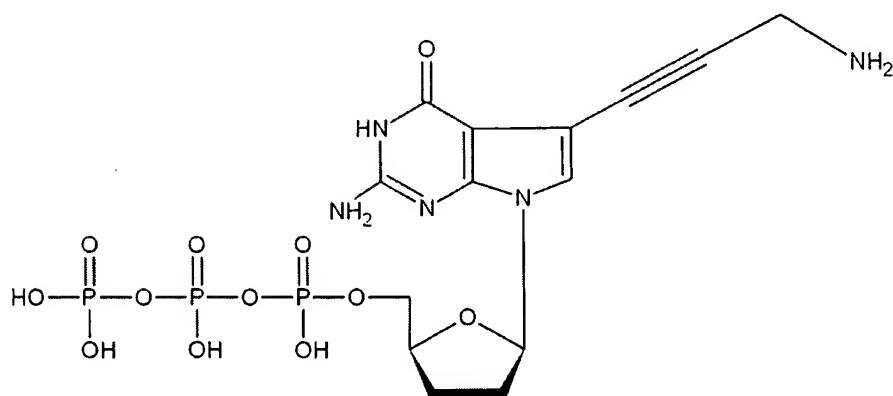
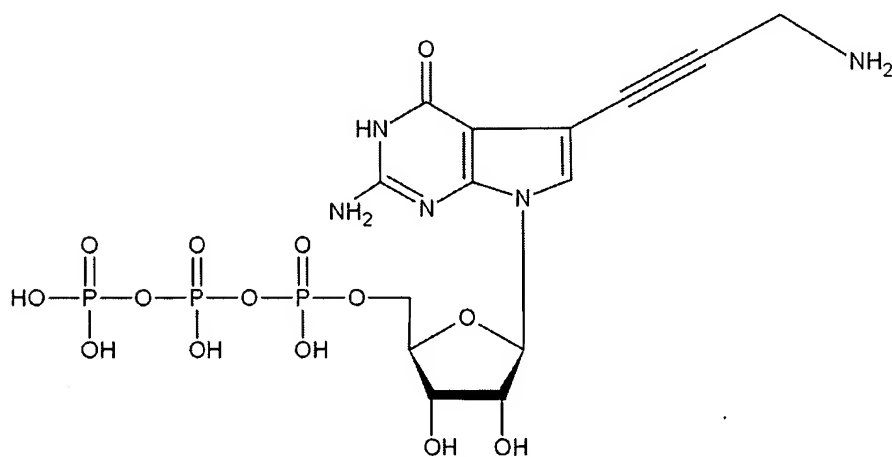
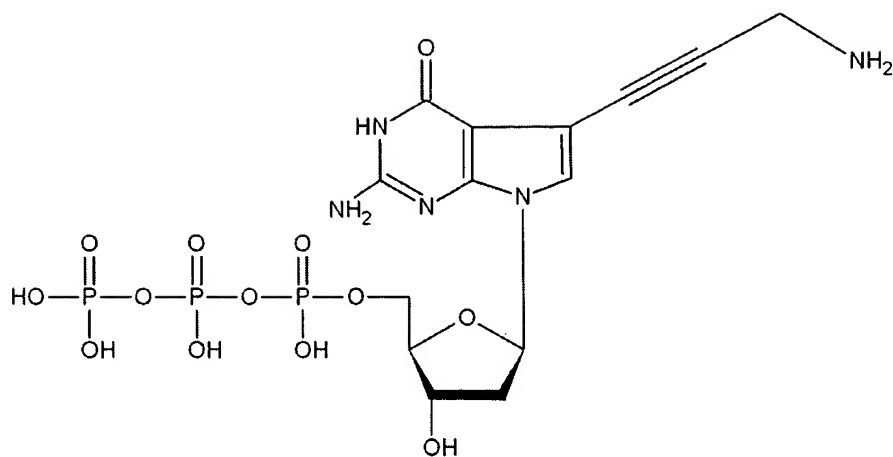


Fig. 15

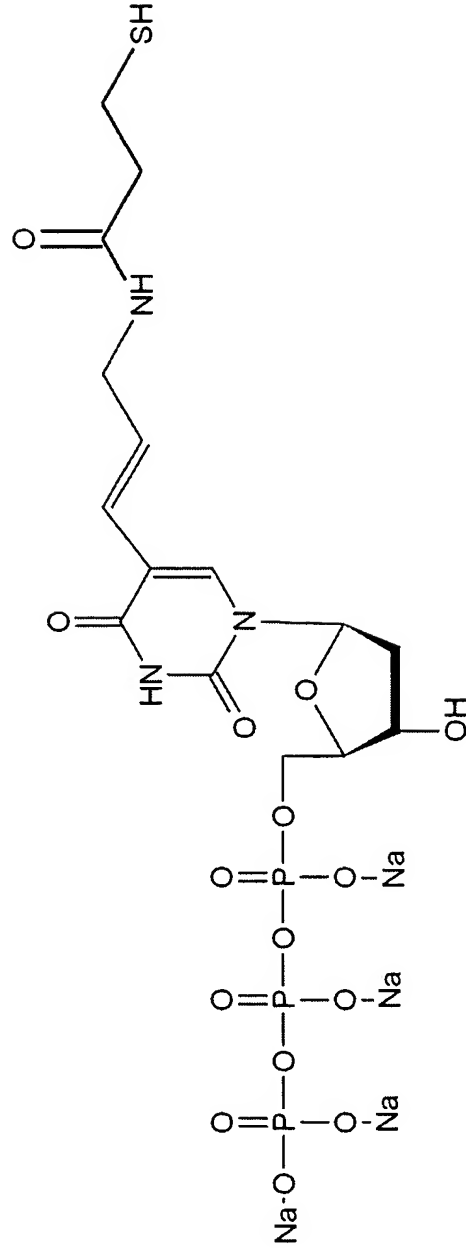




Fig. 16

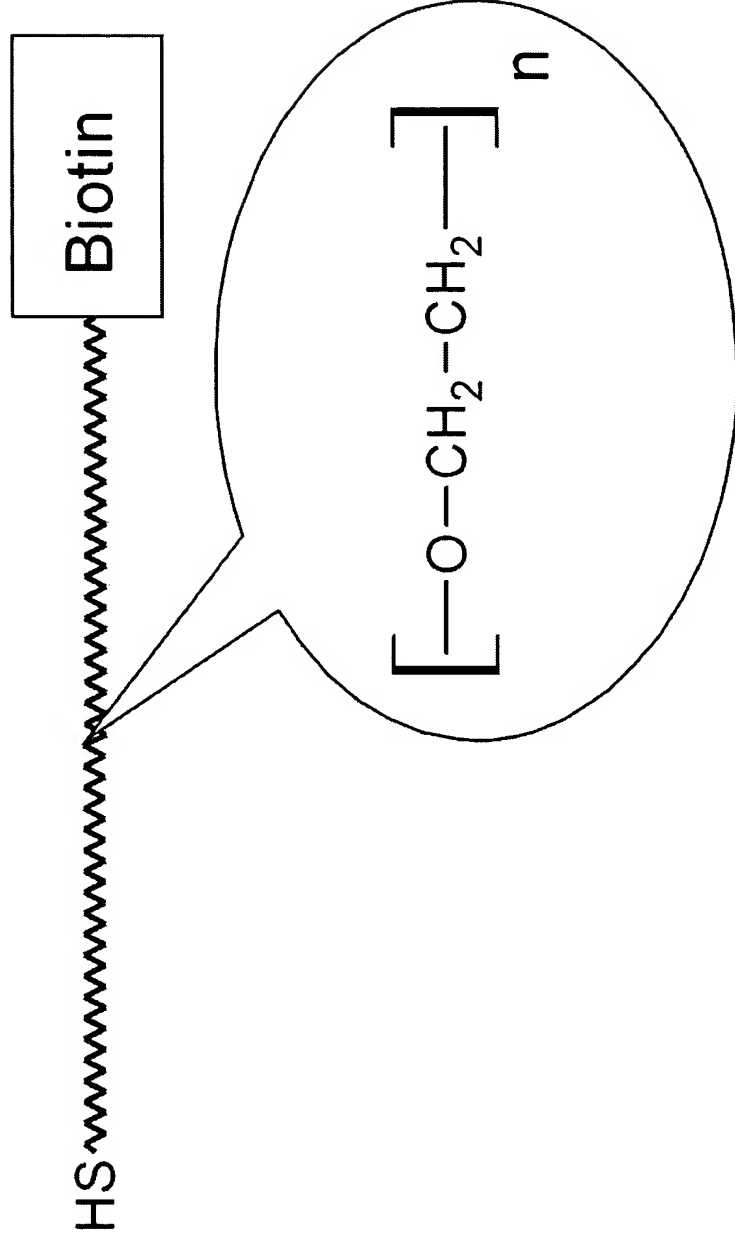


Fig. 17

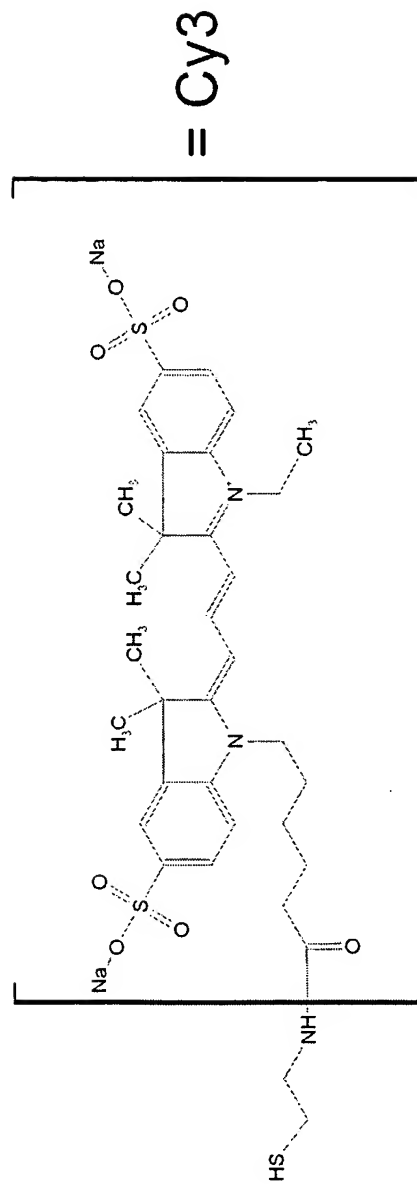


Fig. 18

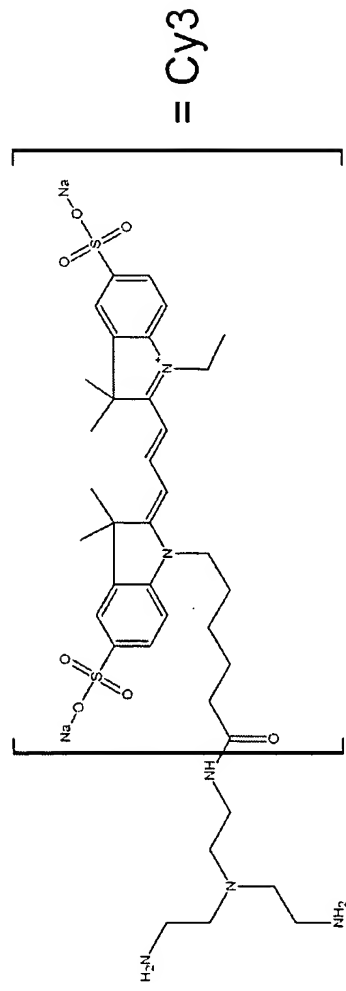


Fig. 19

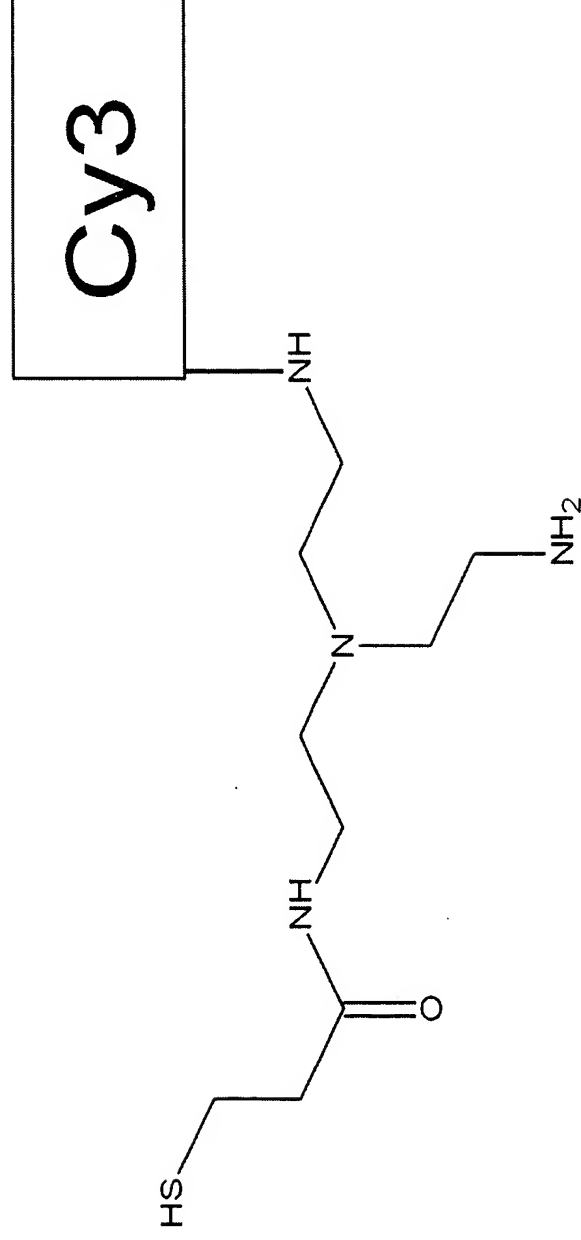


Fig. 20

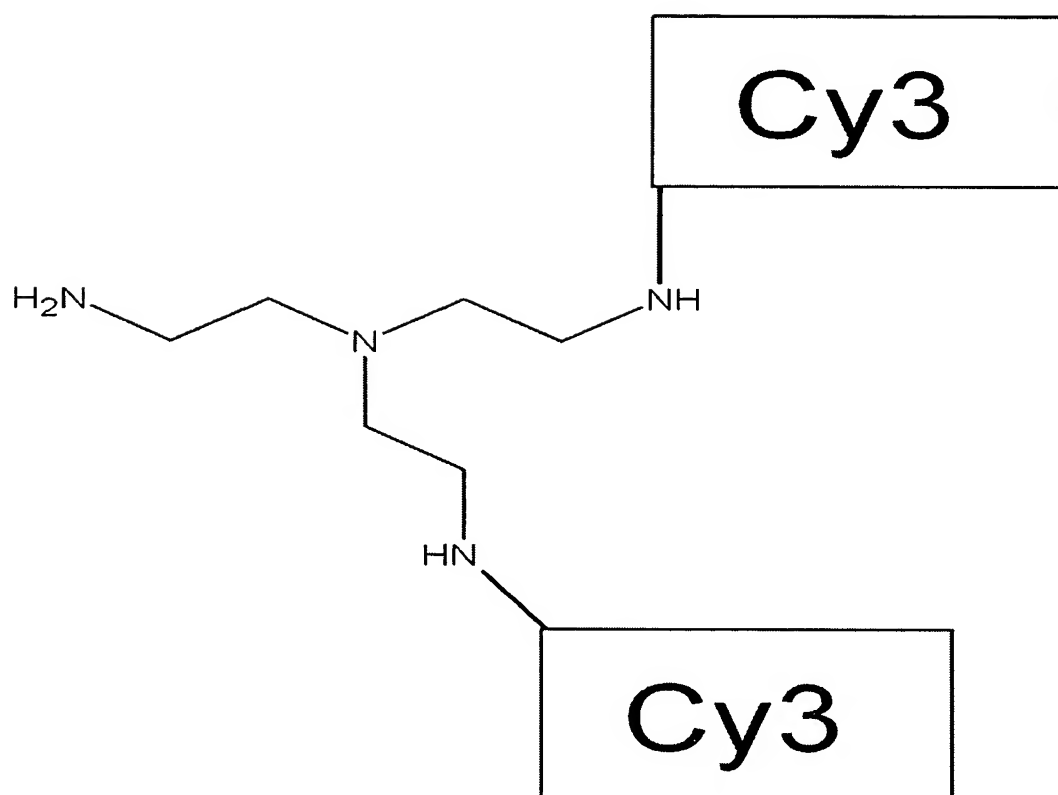


Fig. 21

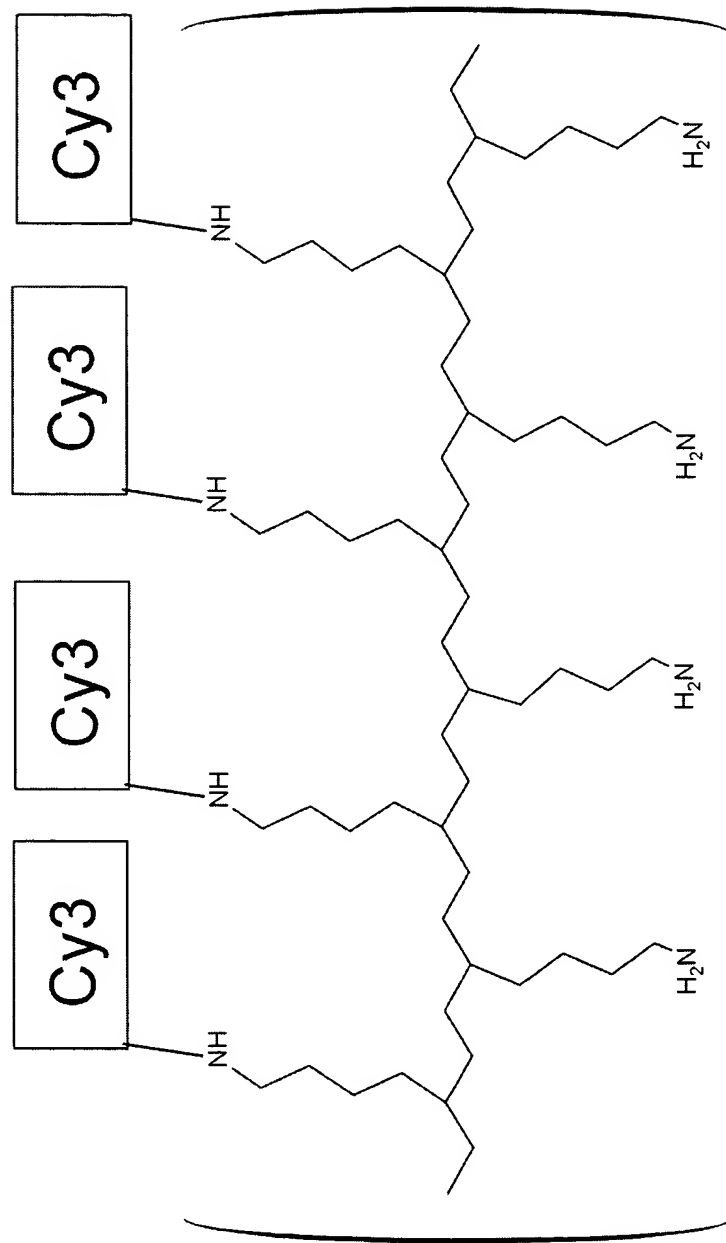


Fig. 22

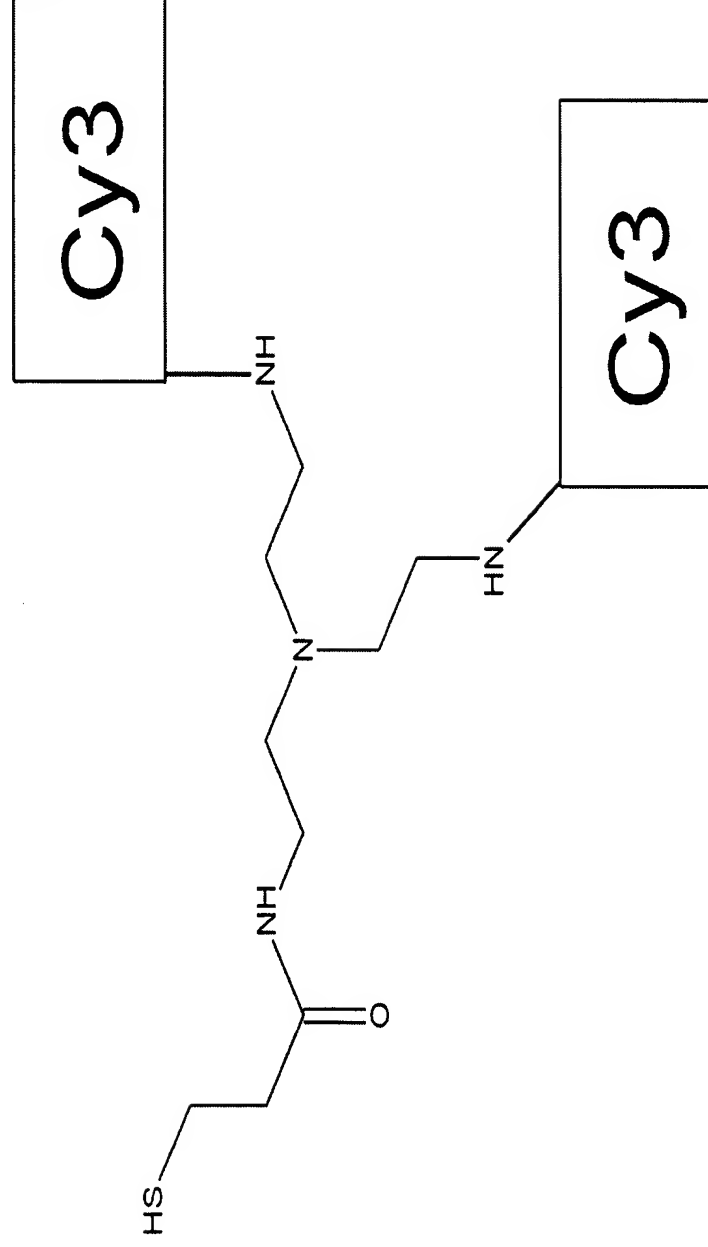


Fig. 23

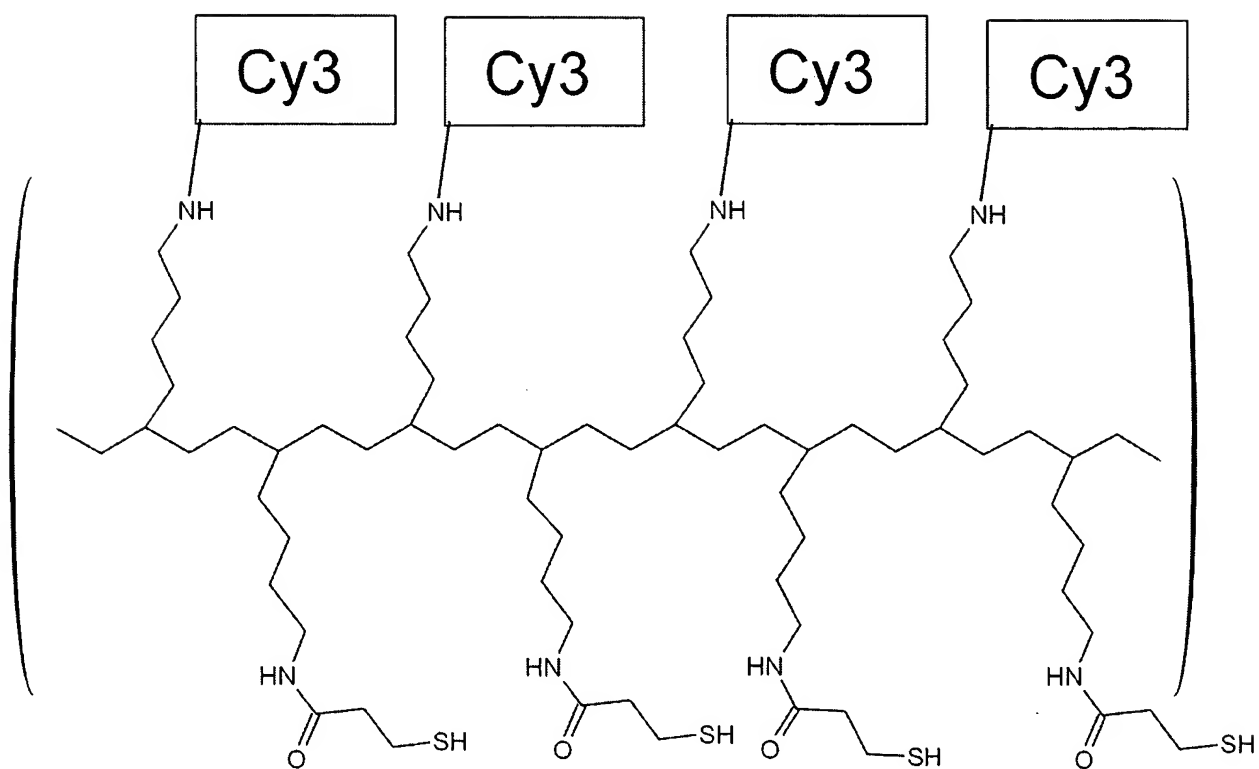
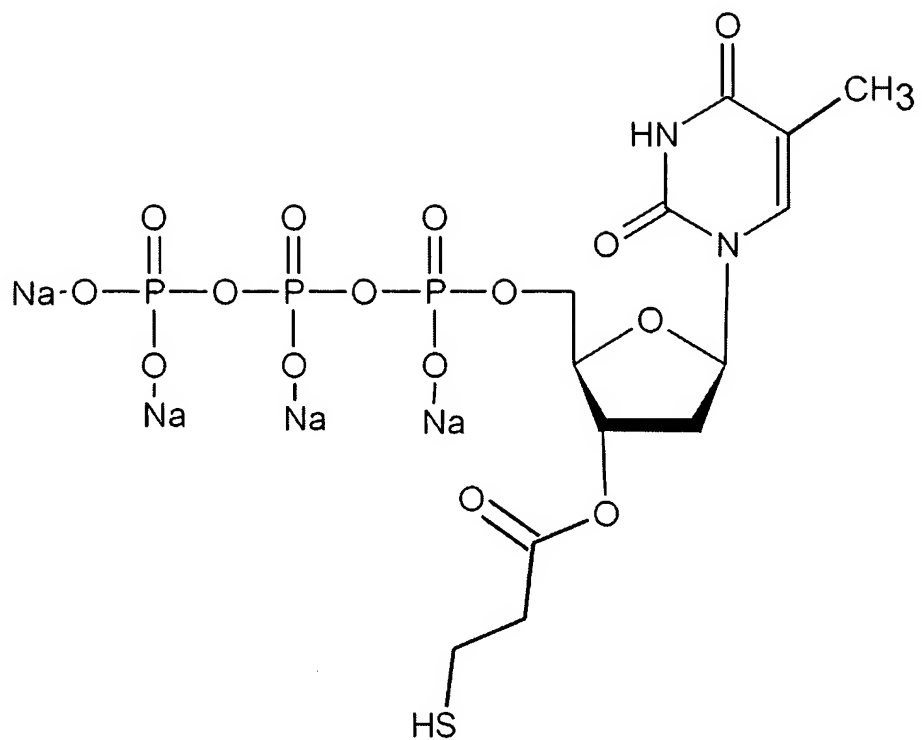




Fig. 24

A)



B)

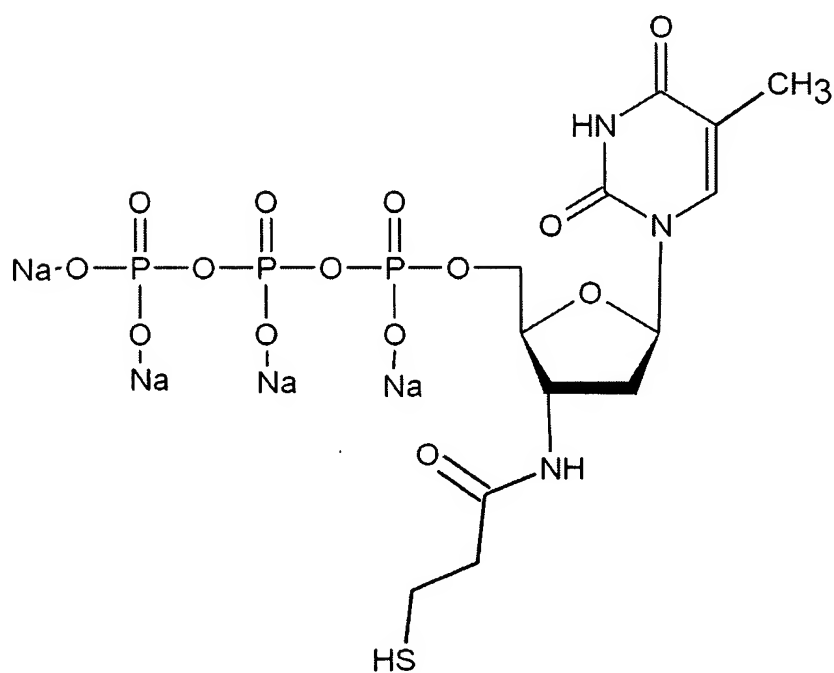


Fig. 25

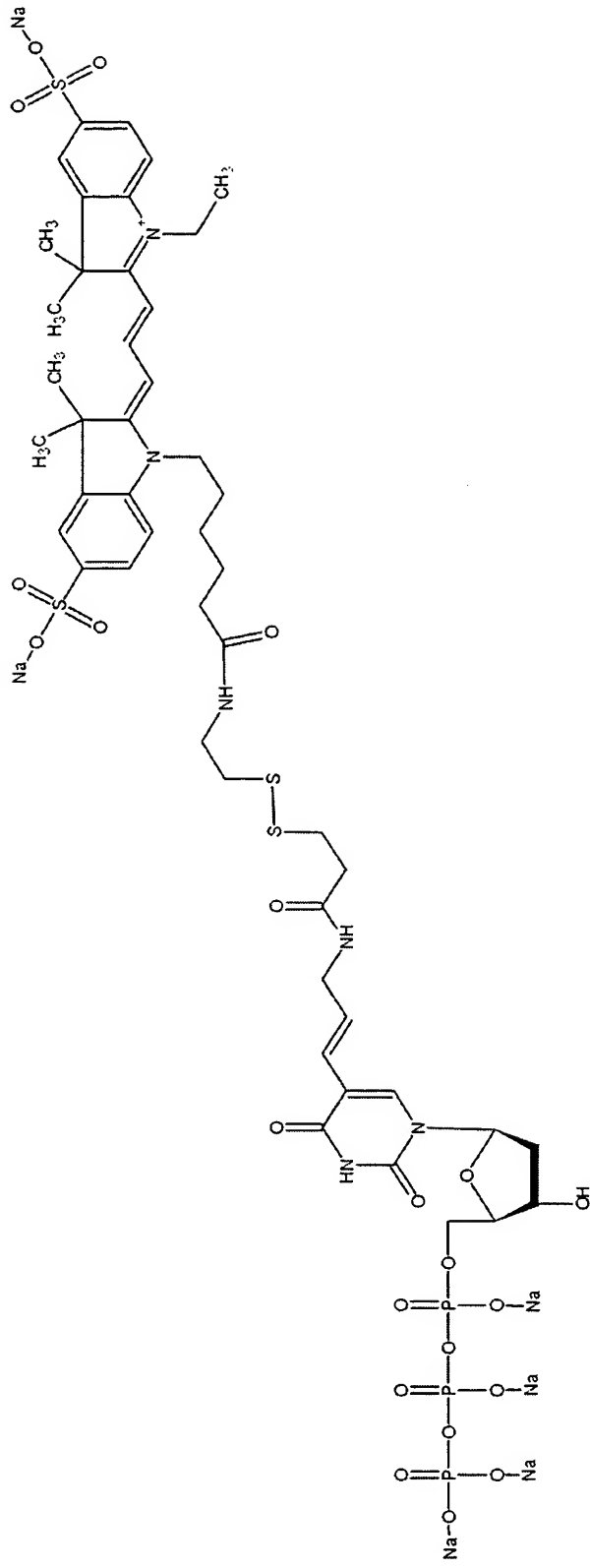


Fig. 26

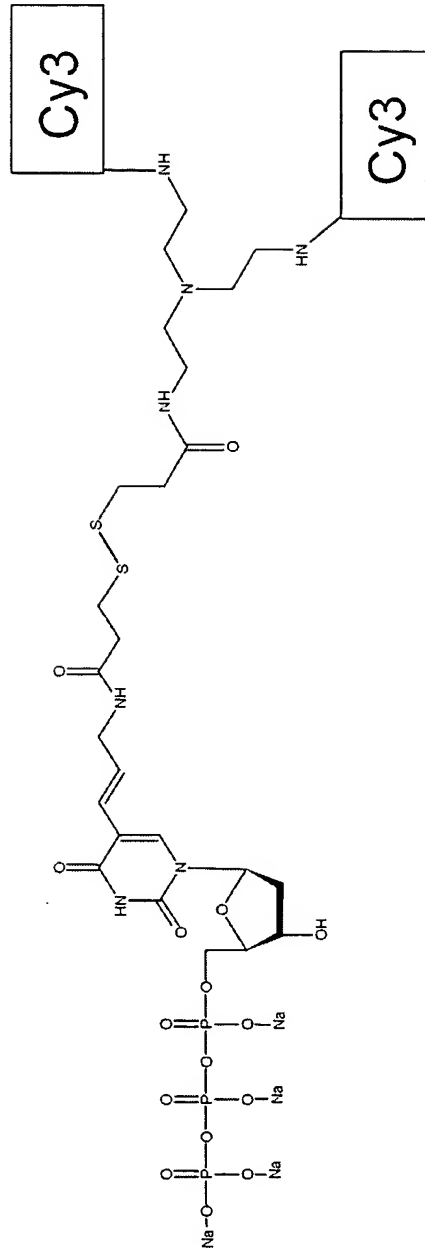


Fig. 27

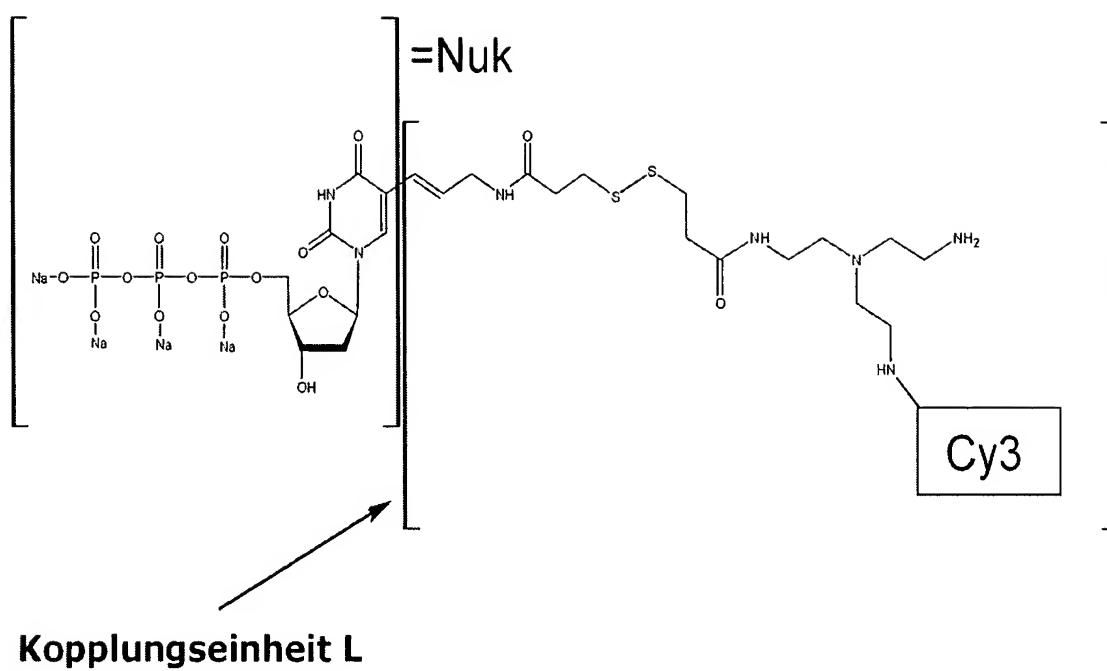
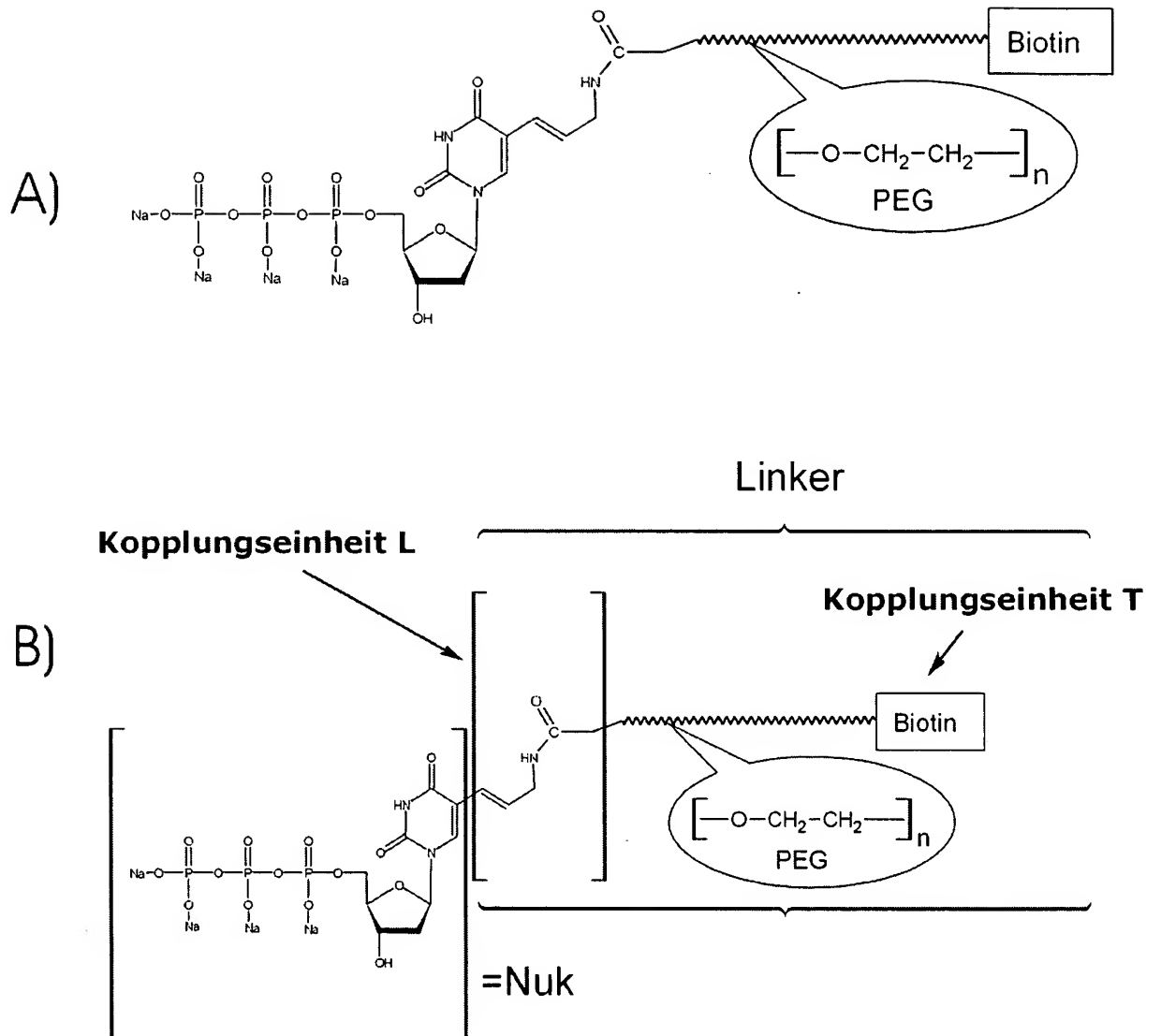


Fig. 28



Legende:

- A) Chemische Struktur der Nuk-Linker-Komponente
- B) Schematische Aufteilung in einzelne Komponenten

Fig. 29

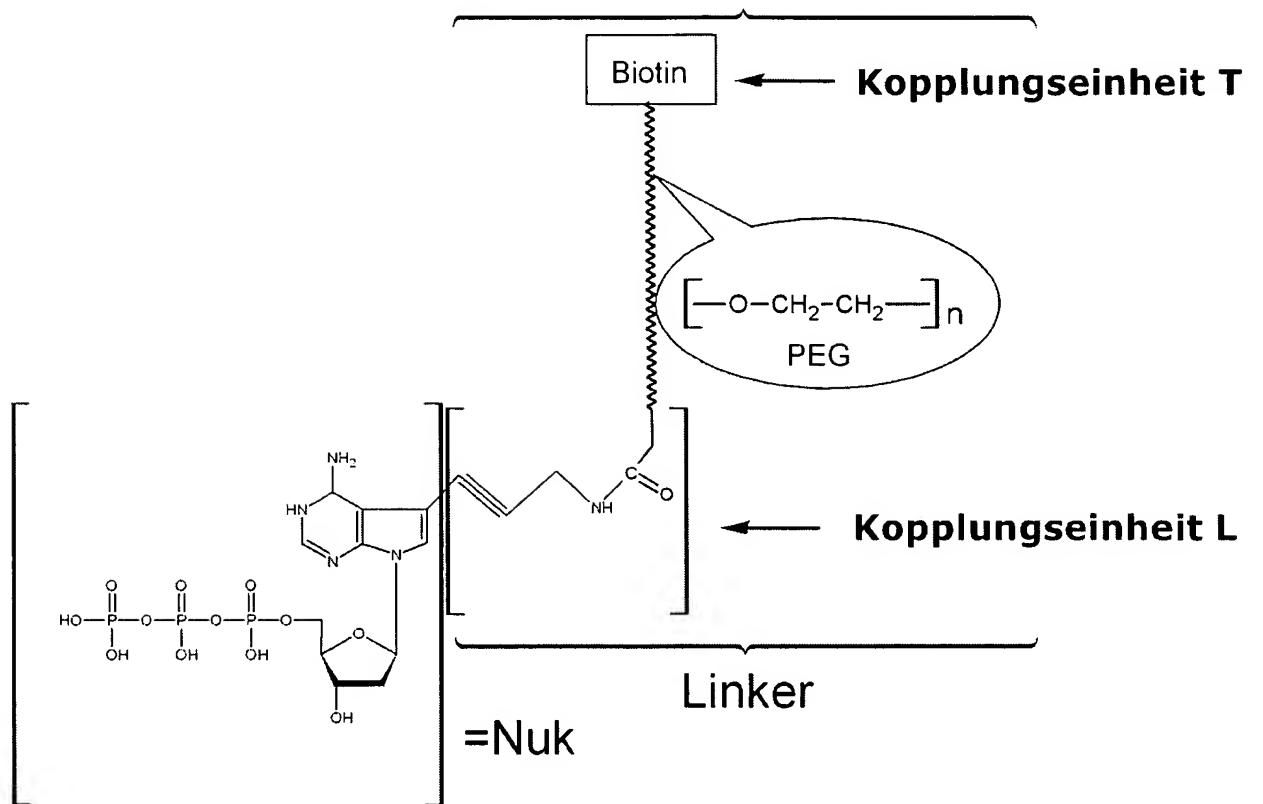


Fig. 30

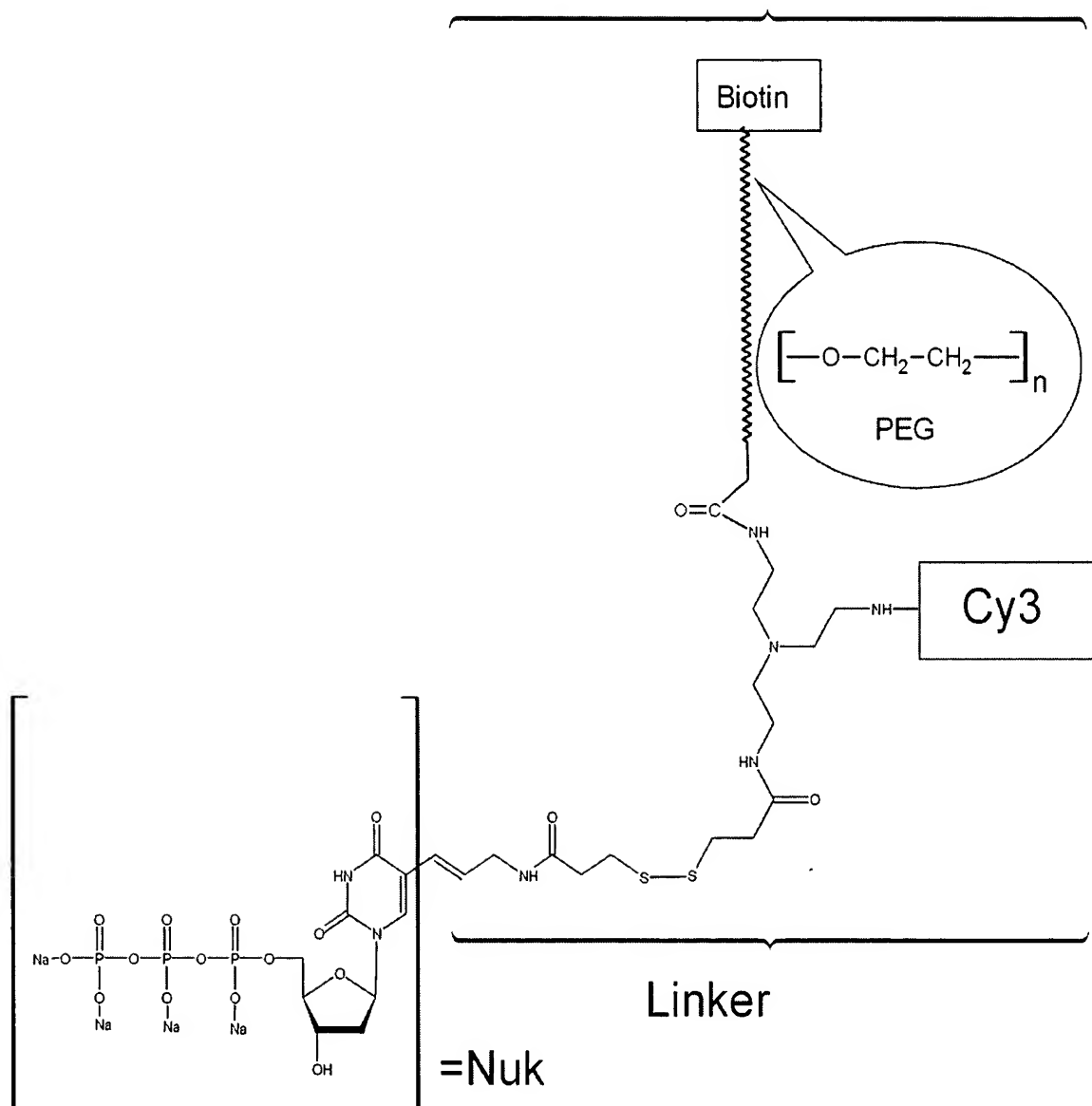


Fig. 31 A

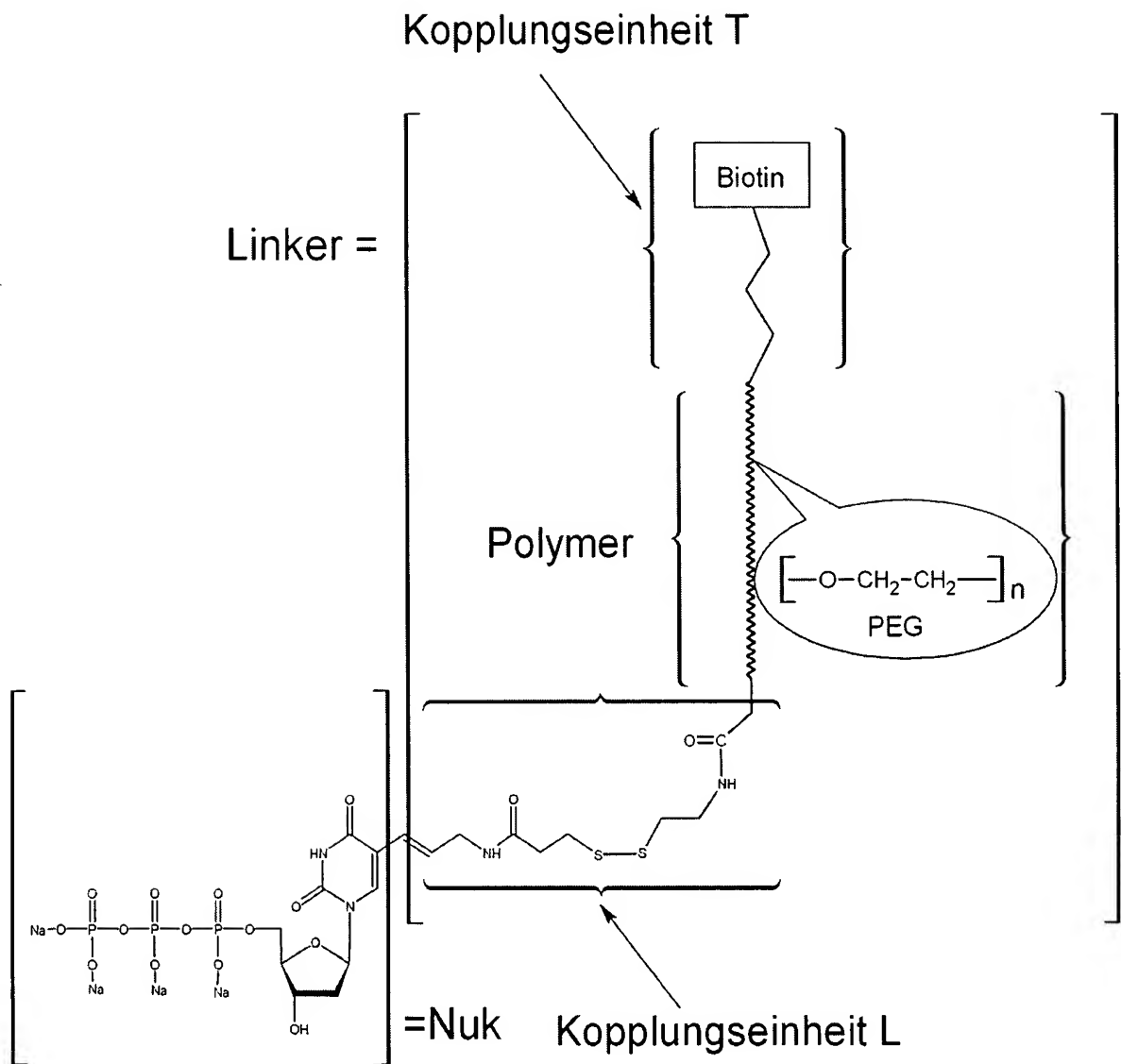




Fig. 31 B

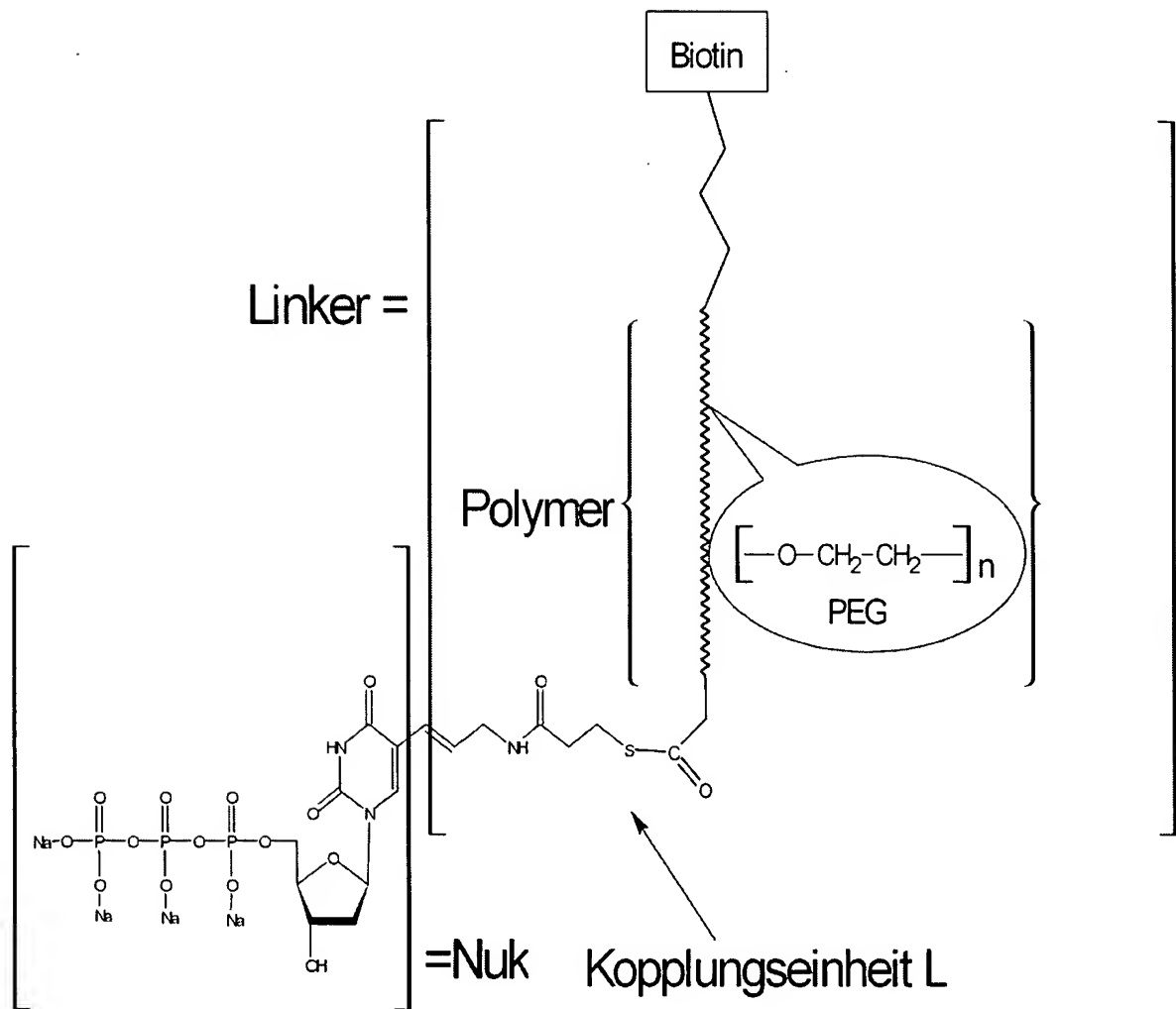
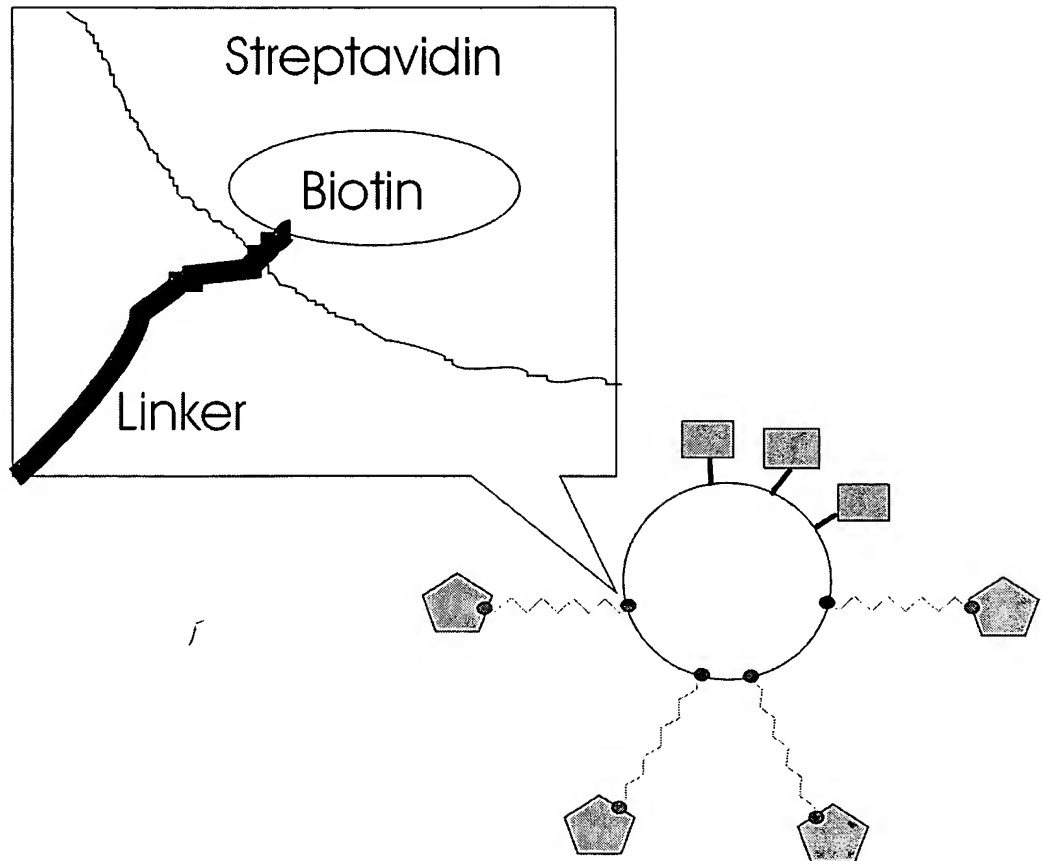


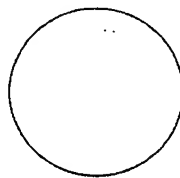
Fig. 32



Legende:



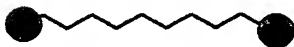
dUTP als  
Nuk-Komponente



Streptavidin als  
Marker-Komponente

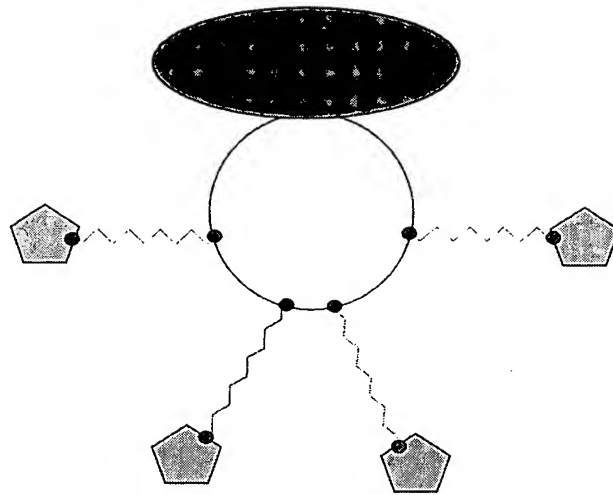


Fluoreszenzfarbstoffe



Linker-Komponente

Fig. 33



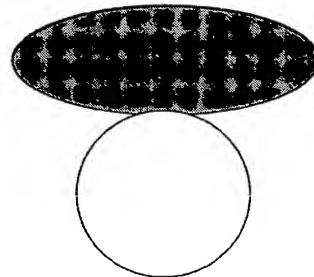
Legende:



dUTP als  
Nuk-Komponente

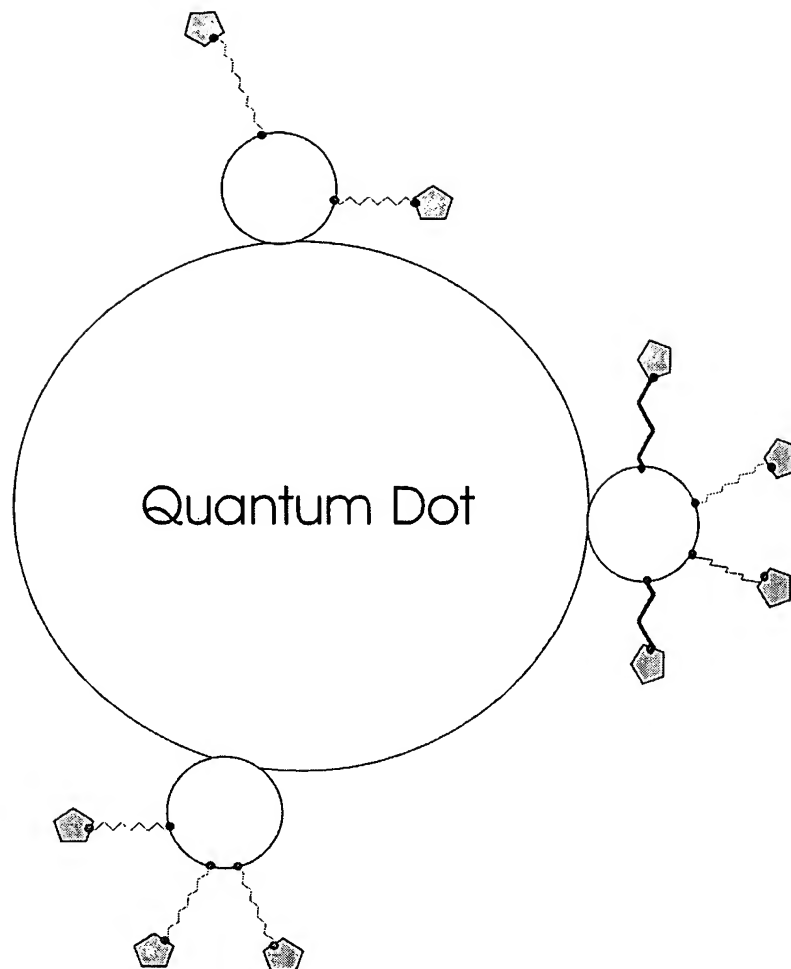


Linker-Komponente



Streptavidin-Enzymkonjugat  
als Marker-Komponente

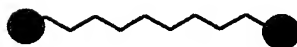
Fig. 34



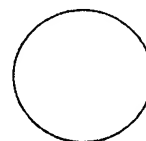
Legende:



dUTP als  
Nuk-Komponente

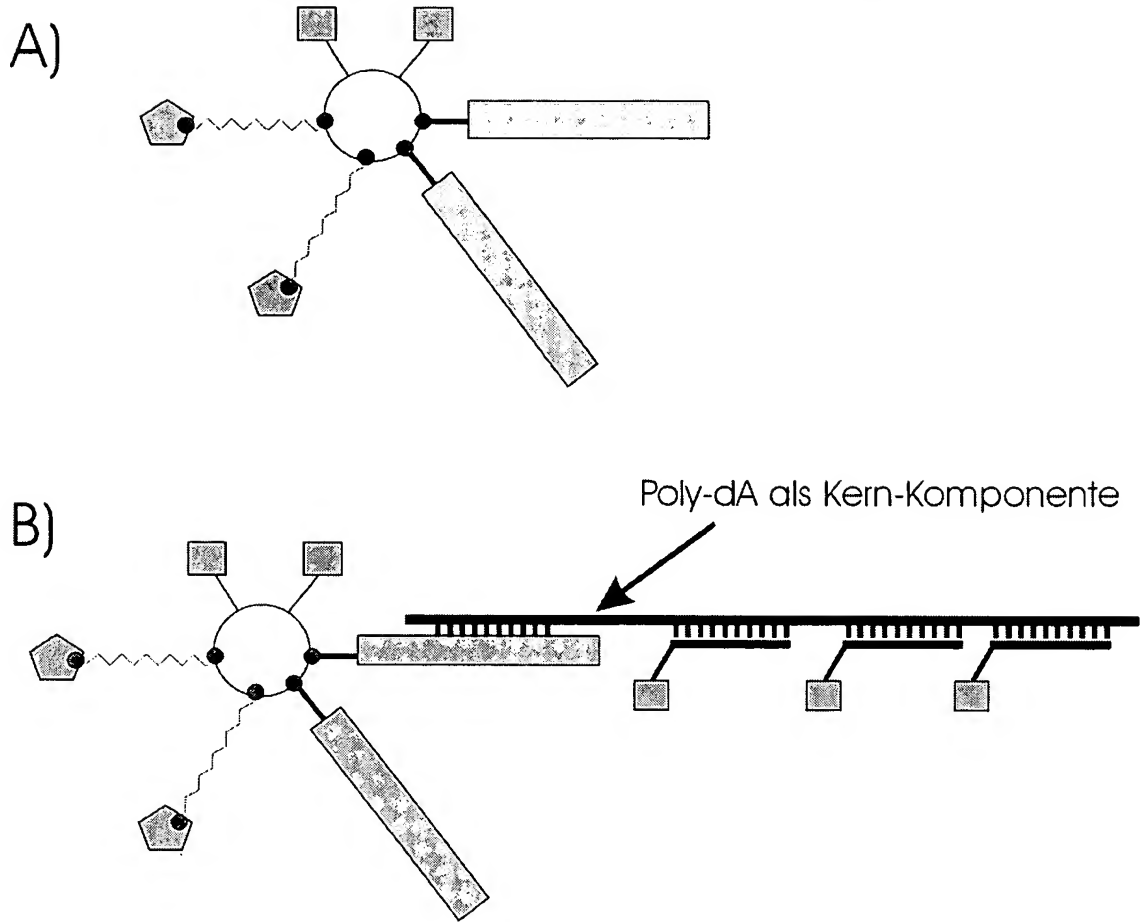


Linker-Komponente



Streptavidin gekoppelt an  
Quantum Dot

Fig. 35



Legende:

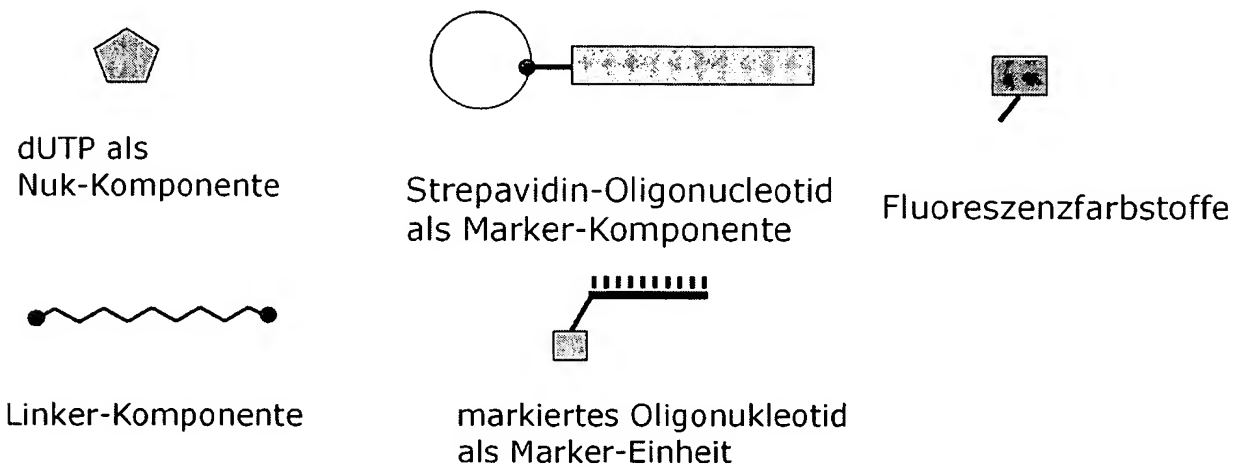
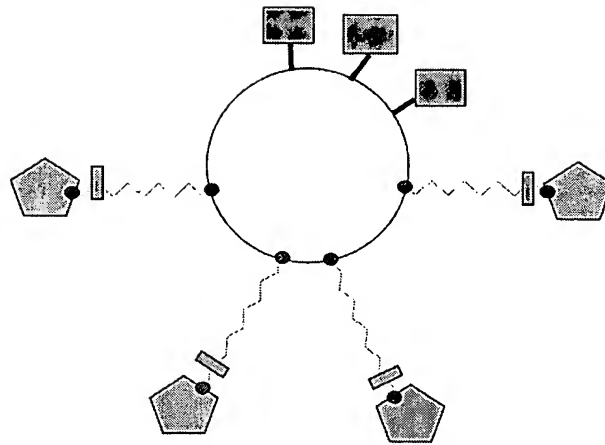


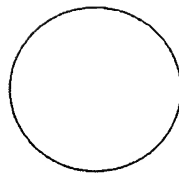
Fig. 36



Legende:



dUTP als  
Nuk-Komponente



Streptavidin als  
Marker-Komponente

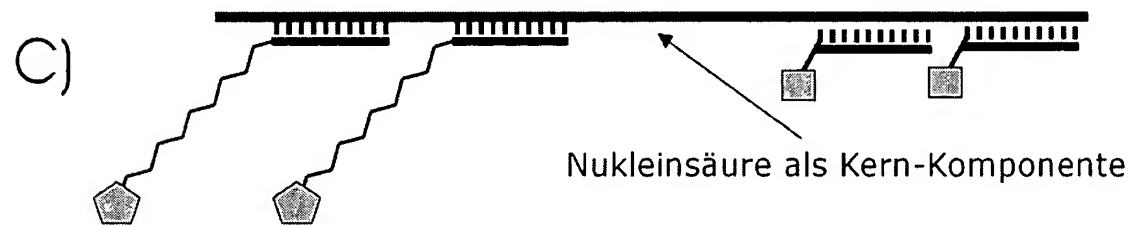
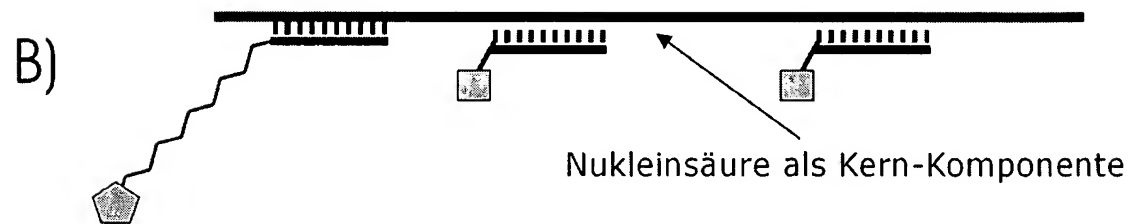
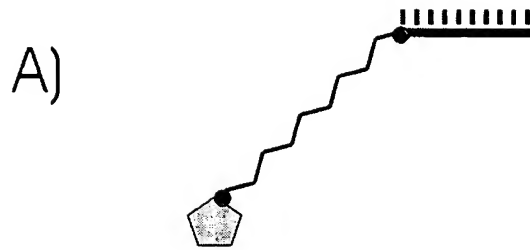


Fluoreszenzfarbstoffe




Linker-Komponente mit  
einer spaltbaren Verbindung

Fig. 37



Legende:

 als Nuk-Komponente dCTP

 Oligonukleotid dT30


 Linker-Komponente

Fig. 38

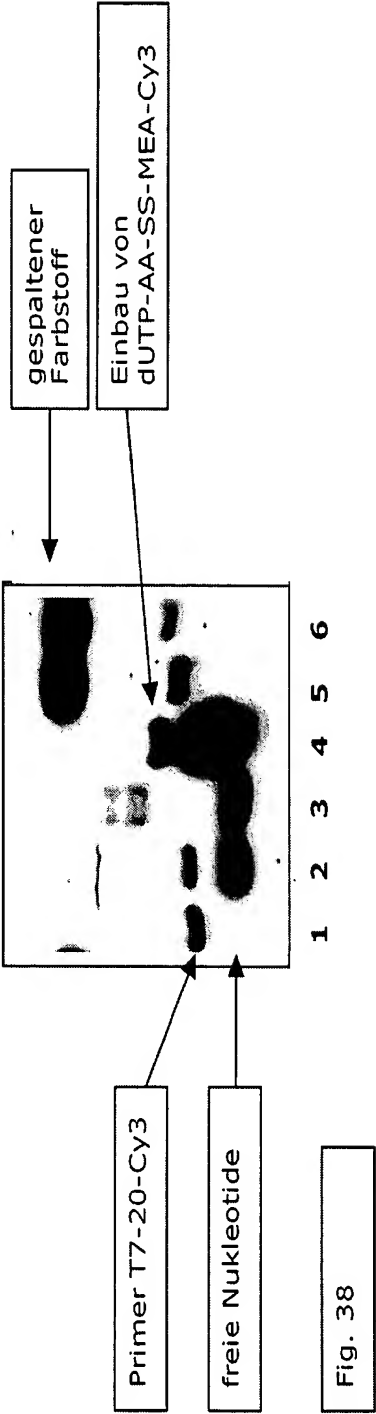


Fig. 38



Fig. 39

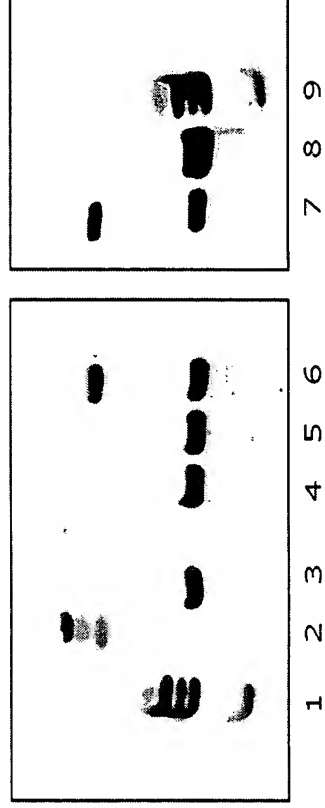


Fig. 40

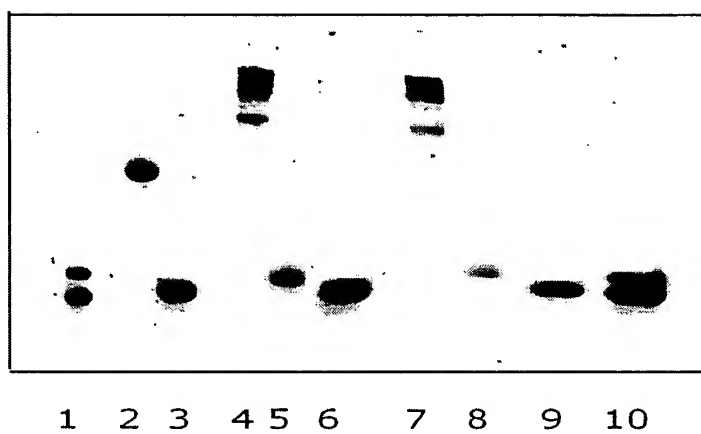


Fig. 41

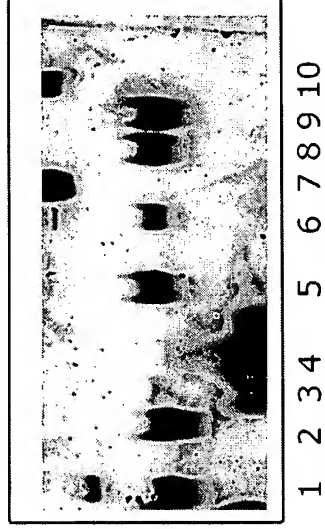


Fig. 42 A

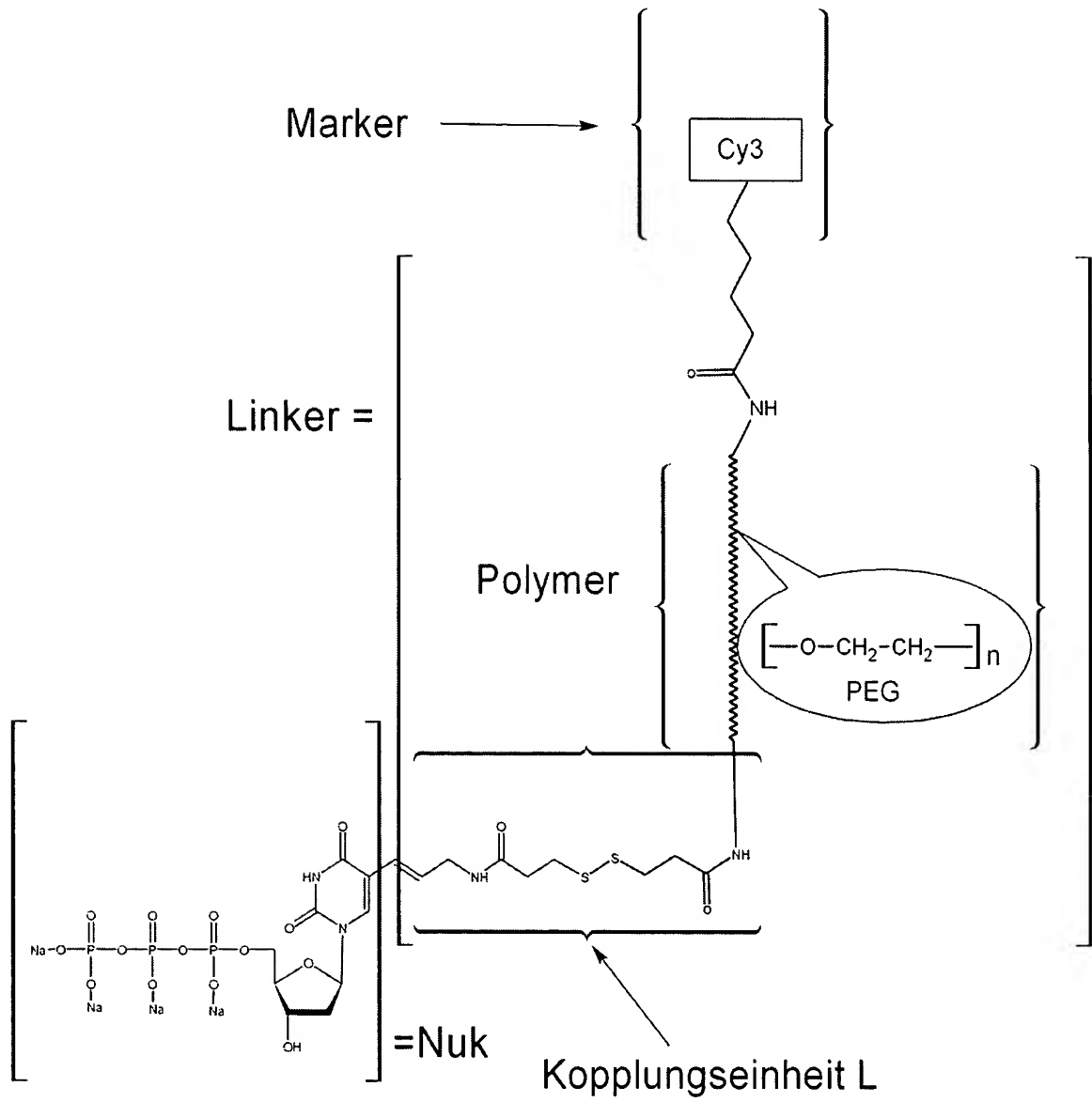


Fig. 42 B

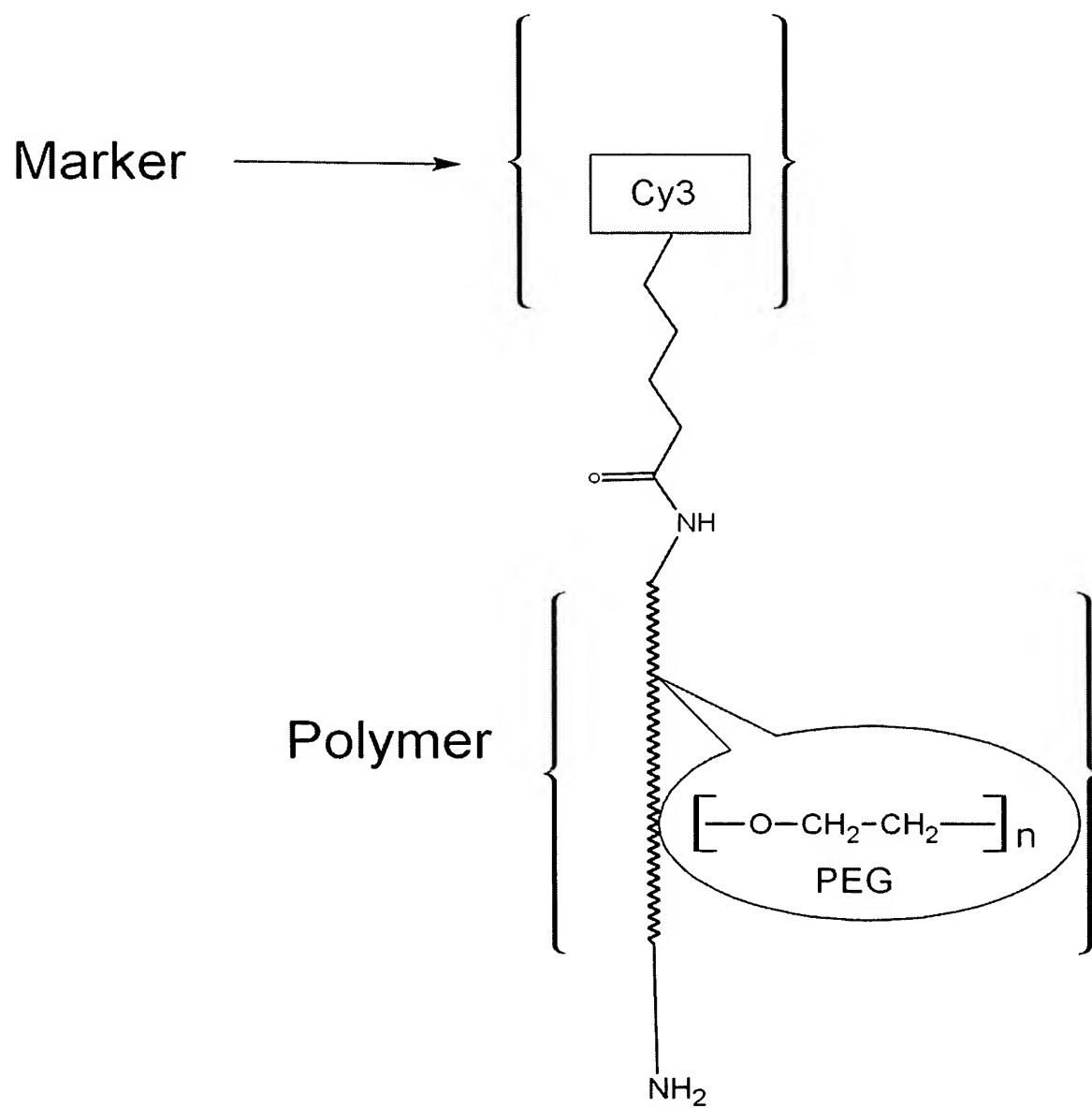


Fig. 43

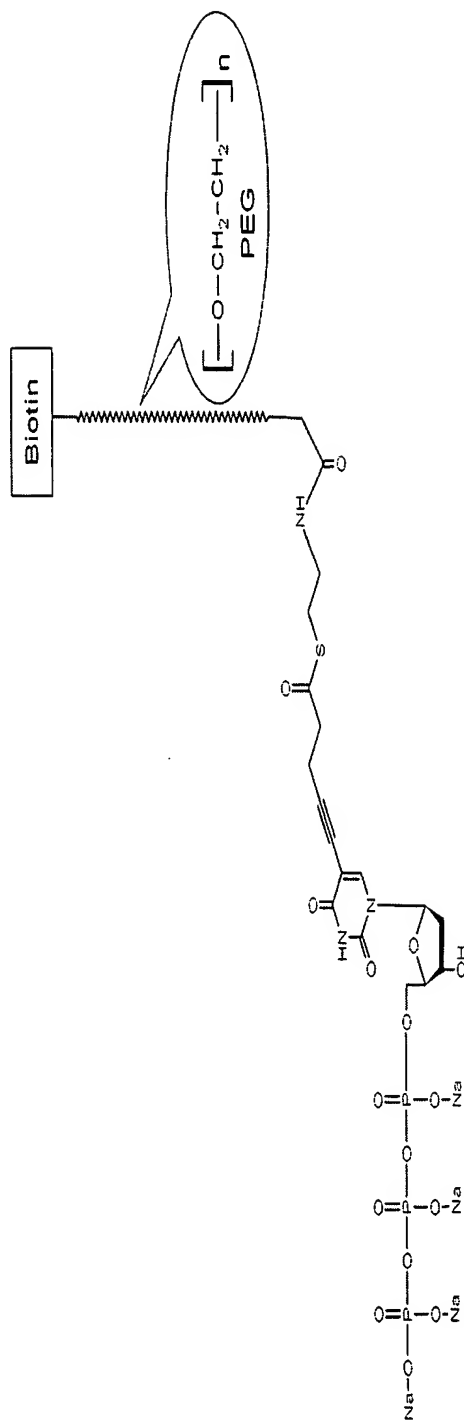


Fig. 44

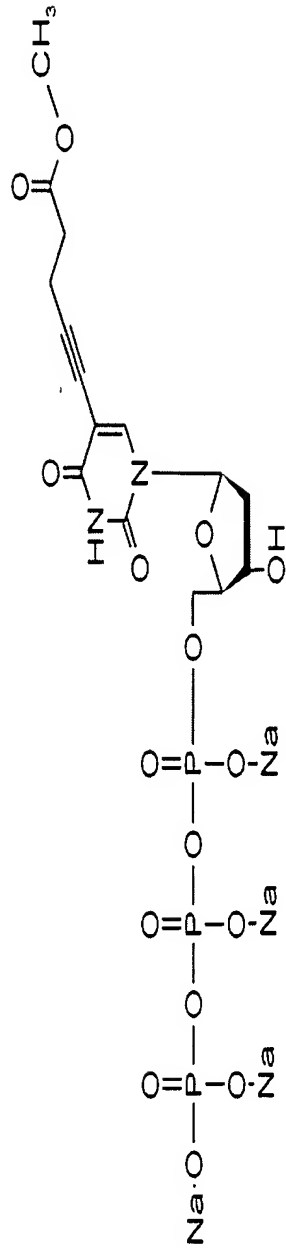


Fig. 45

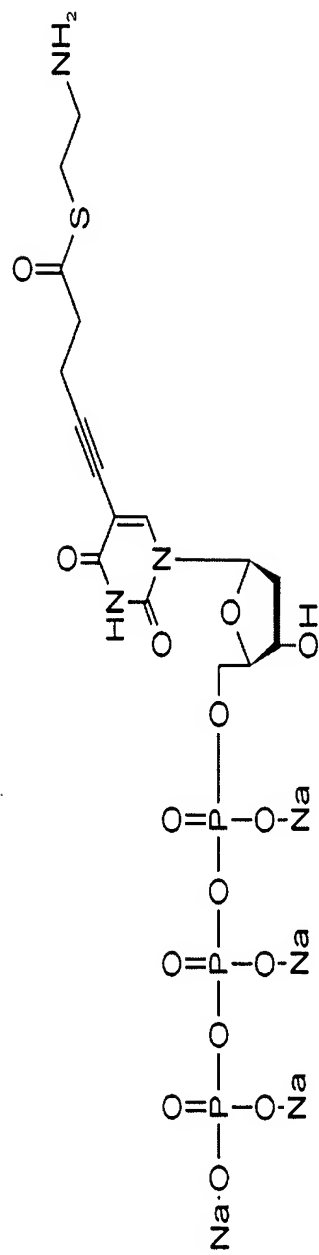




Fig. 46

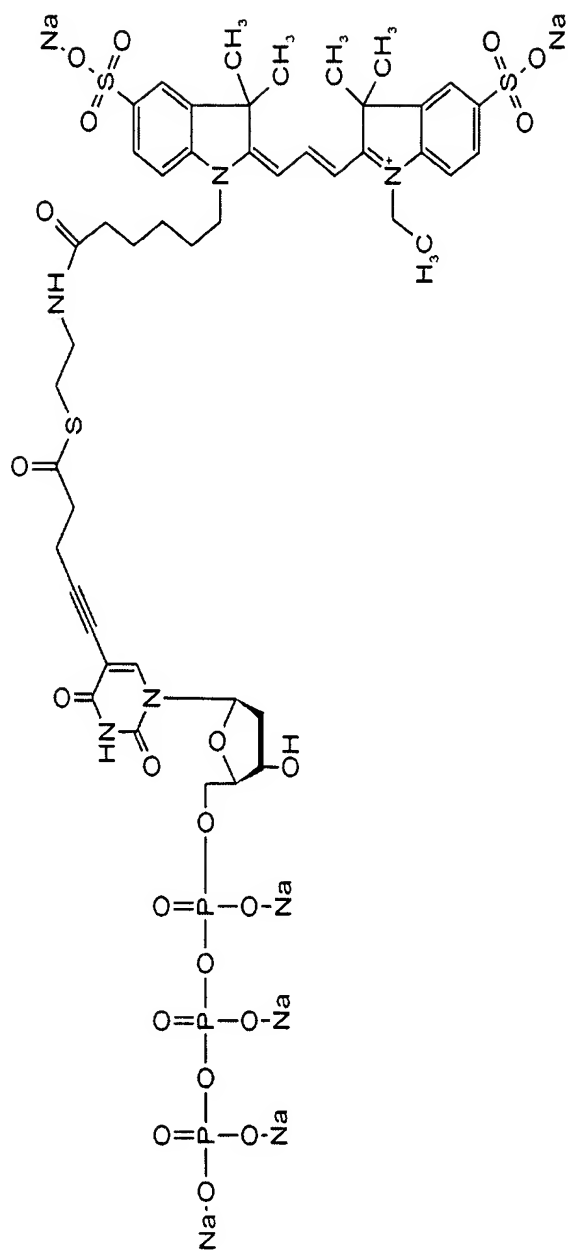


Fig. 47

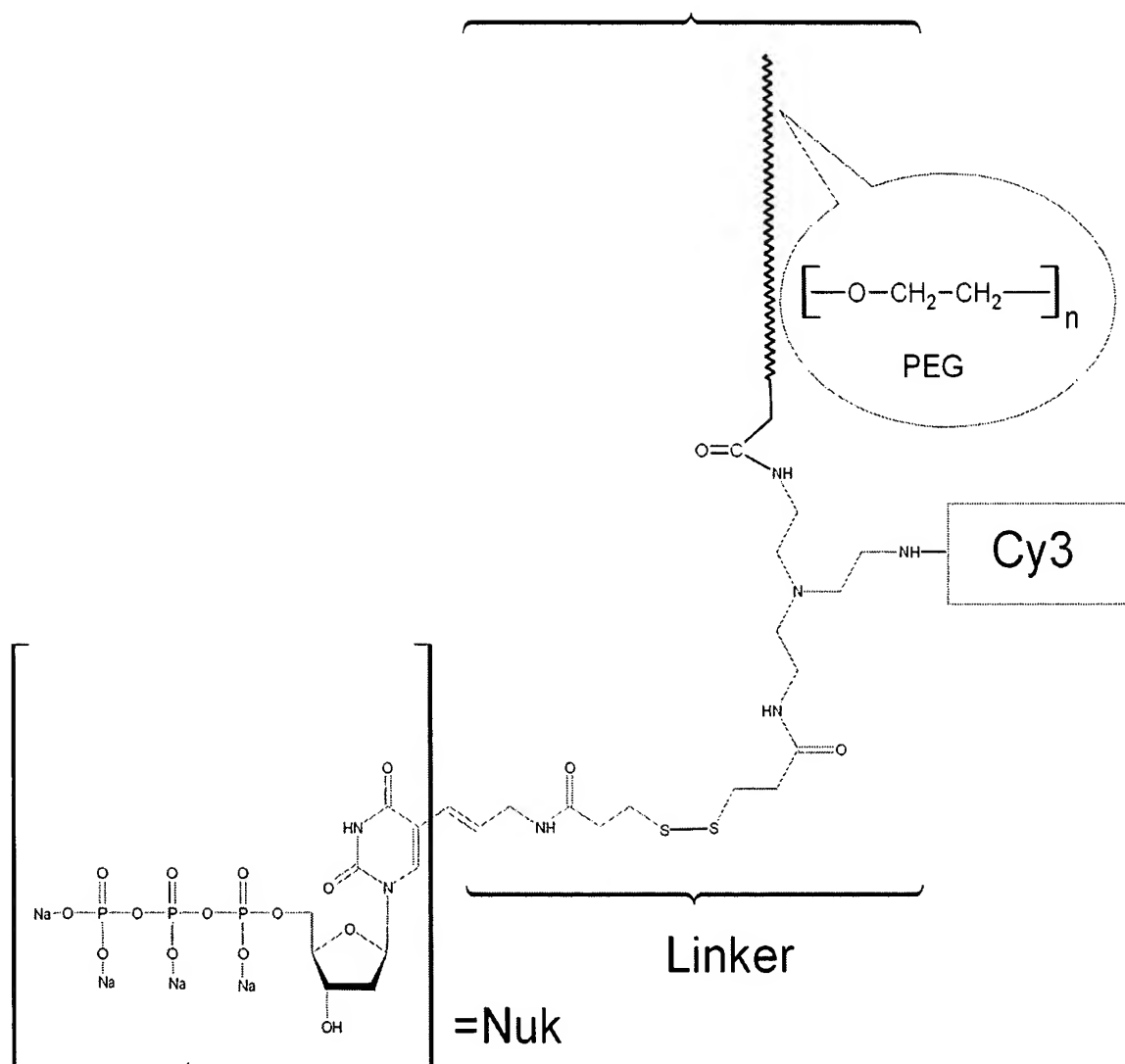


Fig. 48

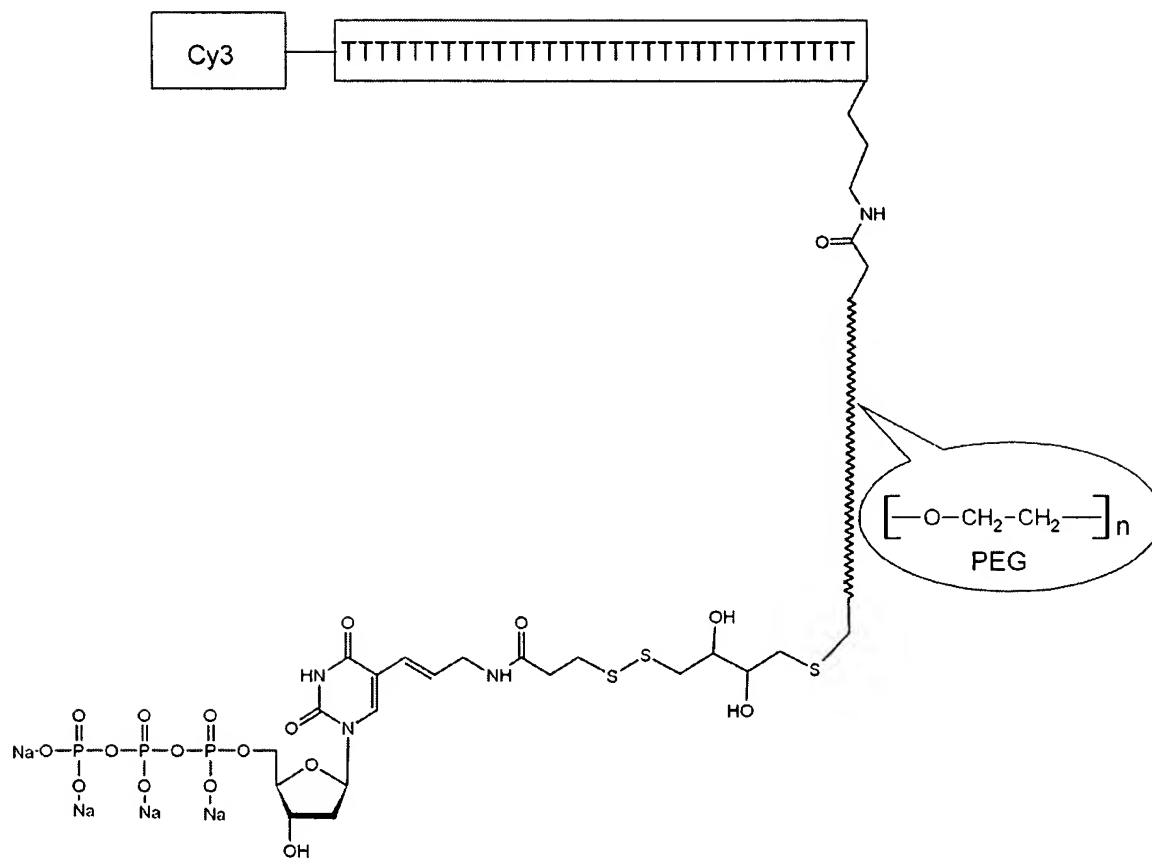


Fig. 49

